



ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay

24/96 Tests

INTENDED USE: ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay uses monoclonal antibodies for the qualitative detection of *Cryptosporidium* Specific Antigen (CSA) in aqueous extracts of fecal specimens.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST: Cryptosporidiosis has recently been recognized as an important human disease in most areas of the world (6, 9). The causative agent, *Cryptosporidium* spp., has been identified in stool specimens of children and adults in many countries and most states in the United States (6). This parasite has been implicated in severe disease in HIV-infected persons (10), day-care centers (1, 2, 11, 12) and waterborne outbreaks (5, 7, 8) in the United States. Groups at particular risk include immunocompromised persons, especially those with HIV infection, family members and sexual partners of infected patients, children and caretakers in child day care centers, animal handlers and travelers (6). Acute symptoms of cryptosporidiosis may include diarrhea, abdominal pain, nausea and vomiting, fever, malaise, and respiratory problems lasting from several days to more than a month and often leading to persistent infection or death in immunologically deficient patients (6). Infection with *Cryptosporidium* may also be asymptomatic.

Cryptosporidium specific antigens have been found associated with *Cryptosporidium* infections and have been used as the basis of fluorescent and antigen capture immunoassays (3, 4, 13). Remel has identified a *Cryptosporidium* specific antigen (CSA) that is produced by *Cryptosporidium* organisms as they multiply within the host intestinal tract. The antigen is specific to *Cryptosporidium* and has not been found to cross-react with other enteric parasites. The antigen is stable to transport through the host intestinal tract as well as to routine procedures used to collect and transport specimens for microscopic examination.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE: ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay is a solid phase immunoassay for the detection of CSA. Diluted stool specimens are added to break-away microplate wells on which anti-CSA antibody is bound. If CSA is present, it is "captured" by the bound antibody. The wells are incubated and then washed to remove unbound material. The enzyme conjugate (monoclonal anti-CSA antibody labeled with horseradish peroxidase enzyme) is added. The wells are incubated and then washed to remove unbound conjugate. In a positive reaction, CSA binds the enzyme to the well. The substrate for the enzyme, TMB, is added. In a positive reaction, the enzyme bound to the well by CSA converts the substrate to a colored reaction product. Color development can be detected visually or spectrophotometrically. In a negative reaction, there is no CSA or an insufficient level of CSA present to bind the enzyme conjugate and no colored reaction product develops.

REAGENTS: The ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay includes sufficient reagents to perform 24 or 96 tests.

| | |
|---|----------------------|
| Reagents | 24 / 96 Test |
| Microplate* | 8 wells/strip |
| Coated with rabbit anti-CSA antibodies | 3 strips/12 strips |
| Enzyme Conjugate* | 1 bottle |
| Peroxidase labeled mouse monoclonal anti-CSA with bovine serum and 0.01% thimerosal | 5 ml/25 ml |
| Positive Control | 1 bottle |
| <i>Cryptosporidium</i> Oocyst Extract | 4 ml |
| Negative Control | 1 bottle |
| Human fecal material with 0.02% thimerosal | 4 ml |
| Specimen Dilution Buffer | 1 bottle |
| Buffered solution with rabbit serum and 0.02% thimerosal | 35 ml/110 ml |
| Wash Buffer | 1 bottle |
| 10X concentrated buffer solution with 0.1% thimerosal | 50 ml/110 ml |
| Color Substrate | 1 bottle |
| TMB in buffer | 5 ml/25 ml |
| Stop Solution | 1 bottle |
| 1.0 N Sulfuric acid (corrosive) | 6 ml |

*Note: Do not interchange reagents between kits with different lot numbers.

SYMBOL DEFINITIONS:

IVD For IN VITRO Diagnostic Use **LOT** Lot **REF** Catalog No.

 Store at 2-8°C  Expiration date

WARNINGS AND PRECAUTIONS:

- For IN VITRO Diagnostic Use Only.
- Reagents are provided at the necessary working strength, with the exception of the Wash Buffer concentrate. Do not dilute reagents, except where instructed.
 - Do not use reagents beyond the expiration dates. Expiration dates are printed on each reagent label. Use of reagents beyond the expiration date may affect the accuracy of results.

3. Microbial contamination of reagents may decrease the accuracy of the assay. Avoid microbial contamination of reagents by using sterile disposable pipettes when removing aliquots from reagent bottles.

4. Reagents are prepared from biological materials and should be handled as potentially infectious. Discard using appropriate biohazard procedures.

5. Microplate strips must be stored in the resealable foil pouch to protect microplate wells from moisture.

6. Specimens may contain potentially infectious agents and should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition".

7. Stool samples must be thoroughly mixed prior to specimen processing to ensure accurate representation of the specimen. DO NOT CONCENTRATE SPECIMENS BEFORE TESTING.


8. Color substrate is sensitive to light exposure. If the reagent is exposed to light and develops color, the reagent must be discarded.

9. Persons who are color blind or visually impaired may not be able to read the test visually and should use spectrophotometric readings to interpret results.

10. Wash Buffer, Specimen Dilution Buffer, Enzyme Conjugate, Negative Control contain thimerosal, which may be irritating to skin, eyes and mucous membranes. In case of contact, flush eyes or skin with copious amounts of water.


11. Discard used Wash Buffer in appropriate biohazard containers.

12. The Wash Buffer (0.1%), Specimen Dilution Buffer (0.02%), Enzyme Conjugate (0.01%) and Negative Control (0.02%) contain thimerosal, which is classified per applicable European Economic Community (EEC) Directives as Dangerous for the environment (N). The following are the appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases.

N  R53
S35
May cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
This material and its container must be disposed of in a safe way.

13. Stop solution is corrosive and should be handled with care. If this solution comes into contact with skin or clothing, flush area with water for 15 minutes. If eyes are exposed, obtain additional medical attention.

14. The Stop Solution contains 2.8% Sulfuric acid, which is classified per applicable European Economic Community (EEC) Directives as an irritant (Xi). The following are the appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases.

Xi  R36
R38
S26
Irritating to eyes
Irritating to skin
In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

PREPARATION OF REAGENTS: Before use, bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) and mix gently. Return the unused reagents to the refrigerator after use.

All reagents, except the Wash Buffer, are supplied in ready-to-use bottles. Reagents can be dispensed directly from the dropper bottles or poured out for use with multichannel pipettes. If excess reagent has been poured, the excess should be discarded. Do not pour excess reagent back into the bottle.

Dilute 10x Wash Buffer concentrate to 1x by adding 1 part concentrate to 9 parts distilled or deionized water. Diluted Wash Buffer is stable for 1 month when stored at 2 - 8°C.

STORAGE AND HANDLING: The expiration date of each kit is stated on the package label. Store all components at 2 - 8°C. Unused microplate strips should be stored in the foil pouch containing desiccant to exclude moisture. The Color Substrate should be stored in and used from the light protected bottle in which it is provided. If an aliquot is removed from the original bottle for any reason, do not return unused Color Substrate to the original bottle.

COLLECTION OF STOOL SPECIMENS: Specimens collected for routine ova and parasite examination can be used for the ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay. Stool specimens should be collected in clean, leak-proof plastic containers. Fresh, untreated stool specimens should be stored at 2 - 8°C and tested within 48 hours. If fresh specimens cannot be tested within 48 hours, they should be frozen at -20 to -70°C. Stool specimens treated with 10% formalin, MF or SAF fixatives may be refrigerated (2 - 8°C) or stored at room temperature (20 - 25°C) and should be tested within 2 months after collection. Stool specimens collected in Cary Blair Transport Medium (or equivalent) should be refrigerated or frozen and tested within 1 week after collection. Stool specimens that have been concentrated or treated with PVA fixatives are not suitable for use. Stool specimens obtained from rectal swabs and diapers are acceptable for use in the ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay.

PROCEDURE NOTES

- Carefully read and follow all instructions in this package insert.
- Allow all reagents and specimens to reach room temperature (20 - 25°C) before use.
- Add reagents to the test wells in the same order throughout the procedure. To avoid contamination do not touch the fluid in the wells with the bottle tips.
- Time each incubation accurately. Start timing after adding reagent to the last well on each plate being tested. To ensure accurate timing, process no more than three 96 well plates at one time. Deviation from the established procedure may alter the performance of the assay.

TEST PROCEDURE :

Required materials provided:

Reagents Transfer pipettes
Microplate Strip Holder & Cover Color Reaction Procedure Card

Required materials not provided:

Stool specimen collection containers Timer that measures minutes
Wash bottle for Wash Buffer Distilled or deionized water

Optional materials not provided:

Microplate reader capable of reading 450nm
Cotton or rayon tipped applicator sticks
Micropipette to deliver volumes to 200µl
Plastic or glass disposable test tubes
Vortex mixer with plate adapter or shaker

Procedure:

- Open the foil pouch, remove the required number of microplate strips and place into a microplate strip holder. Use one well for the Negative Control and one well for the Positive Control. If using less than 8 wells, break off the required number of wells from a strip and return the unused wells to the foil pouch. RESEAL POUCH TIGHTLY TO EXCLUDE MOISTURE AND RETURN TO THE REFRIGERATOR.
- Specimens can be added directly into the wells or pre-diluted in tubes before adding to the wells. Pre-diluted specimens can be held at room temperature (20 - 25°C) for 8 hours or at 2-8°C for 48 hours prior to testing (see below). Choose one of these two methods: See Box **A** for dilution in wells; See Box **B** for pre-dilution in tubes.

A DILUTION IN WELLS

- Unpreserved Solid Specimens:** Label one tube for each specimen. Add **0.4 ml** Specimen Dilution Buffer (SDB) to each tube. Coat **1 swab** with specimen and vigorously mix into SDB. Express as much fluid as possible and discard the swab. Put a transfer pipette into the tube.
- Preserved or Watery Unpreserved Specimens:** Mix by shaking specimen collection containers. No further preparation is necessary.
- Add **4 drops** Negative Control to well A1. Add **4 drops** Positive Control to well B1.
- Add **100 µl** SDB to each specimen well.
- Using transfer pipettes add **2 drops** of each specimen to a well.
Note: Place the opening of the transfer pipettes just inside the wells to avoid splashing into adjacent wells.

PROCEED TO STEP 8

B DILUTION IN TUBES

- Unpreserved Solid Specimens:** Label one tube for each specimen. Add **1 ml** Specimen Dilution Buffer (SDB) to each tube. Coat **1 swab** with specimen and vigorously stir into SDB. Express as much fluid as possible and discard the swab. Put a transfer pipette into each tube.
- Preserved or Watery Unpreserved Specimens:** Label one tube for each specimen. Add **1 ml** SDB to each tube. Mix samples by shaking specimen collection containers. Using transfer pipettes draw up **0.3 ml** (third mark from the tip of the pipette). Expel sample into SDB. Mix by drawing up and down once. Leave transfer pipettes in the tubes.

Diluted specimens may be held for 8 hours at room temperature (20 - 25°C) or 48 hours at 2-8°C.

- Add **4 drops** Negative Control to well A1.
- Add **4 drops** Positive Control to well B1.
- Using transfer pipettes add **0.2 ml** (second mark from the tip of the pipette) of each specimen to a well.

Note: Place the opening of the transfer pipettes just inside the wells to avoid splashing into adjacent wells.

PROCEED TO STEP 8

- Cover the plate and incubate at room temperature (20 - 25°C) for **60 minutes**. Begin timing after the addition of the last specimen.
- Shake out or aspirate the contents of the wells. Wash by completely filling each well with **diluted** Wash Buffer (~350-400 µl/well). Shake out or aspirate all fluid from wells after each wash. Wash a total of **3 times**. After the last wash remove contents and strike plate on clean paper towels or aspirate. Remove as much Wash Buffer as possible but do not allow the wells to dry out at any time.
- Add **4 drops** (200 µl) of Enzyme Conjugate to each well.
- Cover the plate and incubate at room temperature (20 - 25°C) for **30 minutes**.
- Shake out or aspirate and wash each well **5 times** as in step 9.
- Add **4 drops** (200 µl) of Color Substrate to each well.
- Cover the plate and incubate at room temperature (20 - 25°C) for **10 minutes**.
- Add **1 drop** (50 µl) of Stop Solution to each well. Gently tap or vortex the wells until the yellow color is uniform. Read reactions within **10 minutes** after adding stop solution.
- Read visually or spectrophotometrically at 450 nm.

QUALITY CONTROL: Positive and Negative Controls must be included each time the test is performed. The Positive and Negative Controls serve as both reagent and procedural controls. The controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The positive control will not ensure precision at the assay cutoff.

The optical density (O.D.) of the Negative Control should be ≤0.100 at 450nm and should be colorless when read visually. If yellow color equal to 1+ or greater on the Procedure Card is present in the Negative Control, the test should be repeated with careful attention to the wash procedure.

The O.D. of the Positive Control should be ≥0.300 at 450nm, after the O.D. of the Negative Control is subtracted and should be equal to or greater than the 2+ reaction when read visually. If yellow color less than 2+ on the Procedure Card is present in the Positive Control, call for technical assistance.

RESULTS: Refer to enclosed Procedure Card for color interpretations.**Visual:**

1. Read the test results by comparing with the reaction colors on the procedure card.

Positive: yellow color of at least 1+ intensity

Negative: colorless

2. Interpretation of test results:

Positive: If yellow color of at least 1+ intensity develops in the test well, the sample contains CSA and the test is positive.

Note: Tests with faint yellow color (less than 1+) should be repeated.

Negative: A colorless reaction is a negative result and indicates that no CSA or an undetectable level of CSA is present in the sample tested.

Spectrophotometric:

1. Set the spectrophotometer (microplate reader) to read at 450 nm.

2. Read the optical density (O.D.) of the Negative Control.

3. Subtract the O.D. of the Negative Control well from the O.D. readings of the Positive Control well and the test wells before interpreting results.

Note: Readers may be set to blank on the Negative Control well so that the Negative Control well O.D. is automatically subtracted from all of the other readings. If the reader does not have this capability, blank on air and subtract the value of the Negative Control well from the values of the Positive Control and test wells before interpreting results.

4. Read the test results:

Positive: O.D. of ≥ 0.050 blanked value

(i.e. after the O.D. of the Negative Control is subtracted)

Negative: O.D. of < 0.050 blanked value

(i.e. after the O.D. of the Negative Control is subtracted)

5. Interpretation of spectrophotometric results:

Positive: If the blanked O.D. reading is equal to or greater than 0.050 in the test well, the sample contains CSA and the test is positive.

Negative: A blanked O.D. reading less than 0.050 is a negative result and indicates that no CSA or an undetectable level of CSA is present in the sample tested.

***Note:** Any wells that are visually clear but give an O.D. reading that is inconsistent with the visual interpretation should be considered a discrepant reading and examined for the presence of bubbles, small particles in the wells, or an opaque film on the bottom of the well. To remove these, wipe the underside of the wells and read the O.D. again. If the discrepancy between visual and O.D. readings persists, repeat the test.

Limitations of the Procedure: The validity of results with the ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay depends on the control reaction performing as expected. See Quality Control section.

A negative test result does not exclude the possibility of the presence of *Cryptosporidium*, and may occur when the antigen level in the sample is below the detection level of the test. Correlation between the amount of antigen in a sample and clinical presentation has not been established.

As with all IN VITRO diagnostic tests, results should be interpreted by the clinician in conjunction with clinical findings and/or other laboratory results.

Proper specimen collection and processing are essential to achieve optimal performance of the assay. Optimal test results are obtained from specimens tested as soon after collection as possible. See Collection of Stool Specimens section.

ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay has been classified high complexity.

EXPECTED VALUES: The prevalence of *Cryptosporidium* infection varies in different populations and geographic areas. In the U.S., the incidence of *Cryptosporidium* is approximately 0.5 - 3.0% with higher prevalence rates in children (12) and in homosexual males (5, 6).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

Sensitivity and Specificity: Studies were conducted to evaluate the performance of the ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay with specimens obtained from large reference and hospital laboratories which performed O&P testing. A total of 214 specimens were tested; 81 were positive for *Cryptosporidium* by acid-fast (AF) and 133 were negative. Forty of the *Cryptosporidium* negative specimens contained organisms other than *Cryptosporidium* by AF or O&P. The results of these evaluations are presented below:

| | | Acid Fast | | |
|---|---|-----------|-----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpecT [®] <i>Cryptosporidium</i> | + | 81 | 0 | 214 |
| | - | 0 | 133 | |
| | | 81 | 133 | |

Sensitivity 81/81 = 100% (95.5–100%)

Specificity 133/133 = 100% (97.3–100%)

Numbers in parenthesis are 95% confidence intervals.

Clinical studies were conducted to evaluate the performance of the ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay. Specimens were obtained from hospital labs and the CDC. Patient populations represented in the specimen pool were symptomatic patients in normal prevalence populations, symptomatic patients in a high prevalence (HIV positive) population and asymptomatic patients from a day care population. Specimens were submitted unpreserved or preserved in 10% formalin or SAF. Samples were tested for *Cryptosporidium* by either acid-fast (AF) or immunofluorescent staining methods (IFA). A total of 212 specimens were tested; 134 were positive for *Cryptosporidium* specific antigen (CSA) and 78 were

negative. The results with the ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay are presented below:

| | | Acid Fast | | |
|---|---|-----------|----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpecT [®] <i>Cryptosporidium</i> | + | 130 | 0 | 212 |
| | - | 4 | 78 | |
| | | 134 | 78 | |

Sensitivity 130/134 = 97% (92.5–99.2%)

Specificity 78/78 = 100% (95.4–100%)

Numbers in parenthesis are 95% confidence intervals.

A prospective trial was conducted at a large metropolitan hospital. All samples submitted for acid fast staining for *Cryptosporidium* over a period of 4 months were included in the study. Samples were unpreserved and frozen at -20°C prior to testing with the ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay. The results of initial testing and the resolved data are presented below. Data was resolved by repeat testing of the 14 AF negative/CSA positive samples. Six of the fourteen were reproducibly positive for CSA. Specific inhibition studies with antibody to CSA showed greater than 50% inhibition in all 6 samples. These 6 samples are considered to be true positives in the resolved data.

| | | Acid Fast | | Resolved | | |
|---|---|-----------|-----|----------|-----|-----|
| | | + | - | + | - | |
| ProSpecT [®] <i>Cryptosporidium</i> | + | 28 | 14 | 34 | 8 | 378 |
| | - | 1 | 335 | 1 | 335 | |
| | | 29 | 349 | 35 | 343 | |

Sensitivity 28/29 = 97% (82.2–99.9%) 34/35 = 97% (85.1–99.9%)

Specificity 335/349 = 96% (93.4–97.8%) 335/343 = 98% (95.5–99.0%)

Numbers in parentheses are 95% confidence intervals.

Analytical Sensitivity: The ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay detects approximately 20 nanograms/ml of CSA.

Reproducibility: The inter-assay coefficient of variation of the ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay was evaluated by selecting 10 positive specimens with varying optical density readings. Each sample was tested in 10 wells per day for five days. The mean inter-assay CV was 10.6%.

The intra-assay CV was evaluated by testing 24 wells with each of 5 positive specimens. The mean intra-assay CV was 2.52%.

Cross-Reactivity: The ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay has been tested with stool specimens found to be O&P positive for a number of fecal parasites. No cross-reactivity was observed with any of the infectious agents listed below.

| | | |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Ascaris lumbricoides</i> (2) | <i>Entamoeba histolytica</i> (5) | <i>Blastocystis hominis</i> (4) |
| <i>Hymenolepis nana</i> (2) | <i>Endolimax nana</i> (3) | <i>Iodamoeba butschlii</i> (2) |
| <i>Dientamoeba fragilis</i> (4) | <i>Entamoeba hartmanni</i> (2) | <i>Isospora belli</i> (2) |
| <i>Taenia solium</i> (1) | <i>Chilomastix mesnili</i> (1) | <i>Strongyloides stercoralis</i> (2) |
| <i>Entamoeba coli</i> (6) | <i>Giardia lamblia</i> (5) | <i>Trichuris trichiura</i> (1) |

The numbers in parentheses indicate the number of specimens tested.

BIBLIOGRAPHY

- Alpert, G. et al. 1986. "Outbreak of Cryptosporidiosis in a Day-Care Center." *Pediatrics* 77(2):152-157.
- Anon. 1984. "Cryptosporidiosis among children attending day-care centers - Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico." *Morbidity and Mortality Weekly Report* 33(42):599-601.
- Arrowood, M.J. and C.R. Sterling. 1989. "Comparison of Conventional Staining Methods and Monoclonal Antibody-based Methods for *Cryptosporidium* Oocyst Detection." *J. Clin. Microbiol.* 27(7):1490-1495.
- Chapman, P.A., B.A. Rush and J. McLaughlin. 1990. "An enzyme immunoassay for detecting *Cryptosporidium* in faecal and environmental samples." *J. Med. Microbiol.* 32:233-237.
- D'Antonio, R.G. et al. 1985. "A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts." *Ann. Intern. Med.* 103:886.
- Dubey, J.P., C.A. Speer and R. Fayer, eds. 1990. "Cryptosporidiosis of Man and Animals." CRC Press.
- Gallaher, M.M. et al. 1989. "Cryptosporidiosis and Surface Water." *Am. J. Public Health* 79(1):39-42.
- Hayes, E.B. et al. 1989. "Large Community Outbreak of Cryptosporidiosis Due to Contamination of a Filtered Public Water Supply." *N. Eng. J. Med.* 320(21):1372-1376.
- Leech, J.H., M.A. Sande and R.K. Root, eds. 1988. "Parasitic Infections." Churchill Livingstone.
- Navin, T.R. and A.M. Hardy. 1984. "Cryptosporidiosis in Patients with AIDS." *J. Infect. Dis.* 155:150.
- Stehr-Green, J.K. et al. 1987. "Shedding of Oocysts in Immunocompetent Individuals Infected with *Cryptosporidium*." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36(2):338-342.
- Taylor, J.P. et al. 1985. "Cryptosporidiosis Outbreak in a Day-Care Center." *Am. J. Dis. Child.* 139:1023-1025.
- Ungar, B.L.P. 1990. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 28:2491.

ORDERING

ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay 24 Test Kit ...REF 2454024
ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay 96 Test Kit ...REF 2454096

For ordering or customer and technical assistance please call: Remel Inc.

Manufactured by:

Remel Inc.

12076 Santa Fe Drive, Lenexa, KS 66215, USA

General Information **800-255-6730**

Technical Services **800-447-3641**

Order Entry **800-447-3635**

Local / International **913-888-0939**

Local / International Fax **913-888-5884**

Website: www.remel.com Email: remel@remel.com

**Authorized Representative in the European Community:**

Remel Europe Ltd.

Clipper Boulevard West, Crossways

Dartford, Kent, DA2 6PT

UK

IFU 24540GB01, Revised January 7, 2005

Printed in the USA

ProSpecT[®] is a registered trademark of Remel Inc.

remel

ProSpecT® *Cryptosporidium* Microplate Assay

24/96 Bestimmungen

INDIKATIONEN: ProSpecT® *Cryptosporidium* Microplate Assay verwendet monoklonale Antikörper zum qualitativen Nachweis von *cryptosporidium*-spezifischem Antigen (GSA) in wässrigen Extrakten humaner Stuhlproben.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG: Kryptosporidiose ist erst seit kurzem als eine wichtige humane Krankheit in den meisten Gegenden der Welt anerkannt worden (6, 9). Der Krankheitserreger, *Cryptosporidium*, konnte in Stuhlproben von Kindern und Erwachsenen in vielen Ländern und in den meisten Staaten der USA nachgewiesen werden (6). Dieser Parasit wird mit schweren Krankheitsverläufen bei HIV-infizierten Personen (10) und in Kinderstagesstätten (1, 2, 11, 12) in Verbindung gebracht, wie auch mit Endemien in den USA, die durch verunreinigtes Wasser hervorgerufen (5, 7, 8) wurden. Risikogruppen bilden immunsupprimierte Personen, besonders HIV-infizierte Personen, Familienmitglieder und Sexualpartner von infizierten Patienten, Kinder und Erzieher in Kindertagesstätten, Tierhändler und Reisende (6). Die akuten Symptome einer Kryptosporidiose umfassen: Diarrhö, Bauchschmerzen, Brechreiz und Erbrechen, Fieber, Unwohlsein und respiratorische Probleme. Diese können sich über mehrere Tage bis zu einem Monat hinziehen und führen oft zu einer anhaltenden Infektion oder bei Personen mit Immundefekten zum Tod (6). Infektionen mit *Cryptosporidium* können jedoch auch asymptomatisch verlaufen.

Cryptosporidium-spezifische Antigene wurden mit *Cryptosporidium*-Infektionen assoziiert gefunden und bilden die Grundlage für Fluoreszenztests und Antigen-„Capture“-Immunoassays (3, 4, 13). Remel konnte ein *cryptosporidium*-spezifisches Antigen (CSA) identifizieren, das bei der Vermehrung des *Cryptosporidium*-Organismus im Darmtrakt gebildet wird. Das Antigen ist spezifisch für *Cryptosporidium* und zeigt keine Kreuzreaktivität mit anderen Darmparasiten. Das Antigen ist für die Verweilzeit im menschlichen Darmtrakt stabil und kann wie für die meisten Stuhl-Routineuntersuchungen (mikroskopische Untersuchungen des Stuhls) entnommen und transportiert werden.



VERFAHRENSPRINZIPIEN: ProSpecT® *Cryptosporidium* Microplate Assay ist ein Festphasen-Immunoassay zum Nachweis von CSA. Verdünnte Stuhlproben werden in abbrechbare Mikrotitervertiefungen gegeben, die mit Anti-CSA-Antikörpern beschichtet sind. Wenn CSA vorhanden ist, wird es vom gebundenen Antikörper erfasst („captured“). Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um das ungebundene Material zu entfernen. Das Enzymkonjugat (monoklonale, mit Meerrettichperoxidase markierte Anti-CSA-Antikörper) wird zugefügt. Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um ungebundenes Konjugat zu entfernen. Bei einer positiven Reaktion bindet das CSA das Enzym an die Vertiefung. Das Substrat für das Enzym, TMB, wird hinzugefügt. Bei einer positiven Reaktion konvertiert das durch das CSA an die Vertiefung gebundene Enzym das Substrat in ein farbiges Reaktionsprodukt. Die Farbentwicklung kann visuell oder mit einem Spektrophotometer ausgewertet werden. Bei einer negativen Reaktion ist kein oder nicht genügend CSA vorhanden, um das Enzymkonjugat zu binden, und es wird kein farbiges Reaktionsprodukt entwickelt.

REAGENZIEN: Der ProSpecT® *Cryptosporidium* Microplate Assay enthält genügend Reagenzien für die Durchführung von 24 oder 96 Bestimmungen.

| | |
|--|----------------------------------|
| Reagenzien | 24/96 Bestimmungen |
| Mikrotiterplatte* | 8 Vertiefungen / Streifen |
| Beschichtet mit Anti-CSA-Kaninchenantikörpern | 3 Streifen/12 Streifen |
| Enzymkonjugat* | 1 Flasche |
| Mit Peroxidase markiertes monoklonales Maus-Anti-CSA mit Rinderserum und 0,01 % Thimerosal | 5 ml/25 ml |
| Positivkontrolle | 1 Flasche |
| Extrakt von <i>Cryptosporidium</i> -Oozysten | 4 ml |
| Negativkontrolle | 1 Flasche |
| Humanes Fäkalmaterial mit 0,02 % Thimerosal | 4 ml |
| Probenverdünnungspuffer | 1 Flasche |
| Gepufferte Lösung mit Kaninchen Serum und 0,02 % Thimerosal | 35 ml/110 ml |
| Waschpuffer | 1 Flasche |
| 10-fach konzentrierte Pufferlösung mit 0,1 % Thimerosal | 50 ml/110 ml |
| Farbsubstrat | 1 Flasche |
| TMB in Puffer | 5 ml/25 ml |
| Stopplösung | 1 Flasche |
| 1,0 N Schwefelsäure | 6 ml |


*Hinweis: Die Reagenzien von Kits verschiedener Chargennummern dürfen nicht gegeneinander vertauscht werden.

SYMBOLDEFINITIONEN:

| | | | | | |
|---|-------------------------|---|---------------|------------|-------------|
| IVD | Zur In-vitro-Diagnostik | LOT | Charge | REF | Katalog-Nr. |
|  | Bei 2 - 8 °C lagern |  | Verfallsdatum | | |


WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN: Nur zur In-vitro-Diagnostik

- Mit Ausnahme des konzentrierten Waschpuffers liegen die Reagenzien in der erforderlichen Konzentration vor. Die Reagenzien nur verdünnen, wenn ausdrücklich angewiesen.
- Die Reagenzien nicht nach dem Verfallsdatum verwenden. Die Verfallsdaten sind auf jedem Reagenzietikett aufgedruckt. Die Verwendung von Reagenzien nach dem Verfallsdatum kann die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen.
- Eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien kann die Testgenauigkeit vermindern. Beim Entfernen aliquoter Teile aus den Reagenziaschen sterile Einwegpipetten verwenden, um eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien zu vermeiden.
- Die Reagenzien werden aus Biomaterial hergestellt und müssen als potenziell infektiöses Material behandelt werden. Unter Einhaltung entsprechender Verfahren für infektiöses Material („Biohazard“) entsorgen.
- Die Mikrotiterstreifen im wiederverschließbaren Kunststoffbeutel lagern, um die Mikrotitervertiefungen vor Feuchtigkeit zu schützen.
- Die Proben können potenziell infektiöse Mittel enthalten und müssen unter Einhaltung der Sicherheitsstufe 2 („Biosafety Level 2“) entsprechend des CDC/NIH-Handbuchs „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“, 4th Edition, gehandhabt werden.
- Die Stuhlproben vor der Verarbeitung der Probe gründlich mischen, um die Repräsentativität der Probe sicherzustellen. DIE PROBEN VOR DEM TEST NICHT KONZENTRIEREN.
- Das Farbsubstrat ist lichtempfindlich. Wenn das Reagens Licht ausgesetzt wird und Farbe entwickelt, muss es entsorgt werden.
- Bediener, die an Farbenblindheit oder anderen Sehschwächen leiden, können das Testergebnis u. U. nicht visuell ablesen und sollten die Messergebnisse mithilfe eines Spektrophotometers auswerten.
- Der Waschpuffer, der Probenverdünnungspuffer, das Enzymkonjugat sowie die Negativkontrollen enthalten Thimerosal, das die Haut, Augen und Schleimhäute reizen kann. Bei Berührung die Augen oder die Haut mit reichlich Wasser spülen.
- Den benutzten Waschpuffer in entsprechenden Behältern für infektiöses Material („Biohazard“) entsorgen.
- Der Waschpuffer (0,1 %) , der Probenverdünnungspuffer (0,02 %), das Enzymkonjugat (0,01 %) und die Negativkontrolle (0,02 %) enthalten Thimerosal, das gemäß entsprechenden EU-Bestimmungen als umweltschädlich klassifiziert ist (N). Im Folgenden handelt es sich um die entsprechenden Risiko- (R) und Sicherheits- (S) hinweise.

| | |
|---|--|
| N | Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben. |
|  | R53 S35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden. |

13. Die Stopplösung ist ätzend und muss mit Vorsicht gehandhabt werden. Wenn diese Lösung mit der Haut oder Kleidung in Berührung kommt, den Bereich 15 Minuten lang mit Wasser spülen. Bei Kontakt mit den Augen sofort einen Arzt aufsuchen.

14. Die Stopplösung enthält 2,8 % Schwefelsäure, die gemäß der entsprechenden EU-Bestimmungen als Reizstoff (Xi) klassifiziert ist. Im Folgenden handelt es sich um die entsprechenden Risiko- (R) und Sicherheits- (S) hinweise.

| | |
|---|---|
| Xi | Reizt die Augen |
|  | R36 R38 S26 Reizt die Haut Bei Berührung mit den Augen sofort mit viel Wasser ausspülen und einen Arzt aufsuchen. |

VORBEREITUNG VON REAGENZIEN: Vor der Verwendung alle Reagenzien auf Zimmertemperatur (20 - 25 °C) bringen und vorsichtig mischen. Die unbenutzten Reagenzien nach der Verwendung wieder kühl stellen.

Mit Ausnahme des Waschpuffers werden die Reagenzien gebrauchsfertig in Flaschen geliefert. Die Reagenzien können direkt von den Tropfflaschen entnommen oder zum Verwenden mit einer Mehrkanal-Pipette in ein Gefäß gegossen werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagens muss entsorgt werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagens nicht wieder in die Flasche füllen.

10-fach konzentrierten Waschpuffer auf eine einfache Konzentration verdünnen; hierzu ein Teil Konzentrat zu 9 Teilen destilliertes oder deionisiertes Wasser hinzufügen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2 bis 8 °C einen Monat stabil.

LAGERUNG UND HANDHABUNG: Das Verfallsdatum jedes Kits befindet sich auf dem Verpackungsetikett. Alle Komponenten bei 2 bis 8 °C lagern. Die unbenutzten Mikrotiterstreifen müssen im Kunststoffbeutel, der Trockenmittel enthält, gelagert werden, um sie vor Feuchtigkeit zu schützen. Das Farbsubstrat in der lichtgeschützten Flasche, in der es geliefert wird, aufbewahren und daraus entnehmen. Wenn aus einem beliebigen Grund ein aliquoter Teil aus der Flasche entnommen wird, das unbenutzte Farbsubstrat nicht wieder in die Flasche füllen.

ENTNEHMEN DER STUHLPROBEN: Stuhlproben, die für routinemäßige parasitologische Untersuchungen entnommen wurden, können für den ProSpecT® *Cryptosporidium* Microplate Assay verwendet werden. Die Stuhlproben sollten in sauberen, dicht verschlossenen

Kunststoffbehältern gesammelt werden. Die frischen, unbehandelten Stuhlproben sollten bei 2 bis 8 °C gelagert und innerhalb von 48 Stunden getestet werden. Wenn die frischen Stuhlproben nicht innerhalb von 48 Stunden getestet werden können, sollten sie bei -20 bis -70 °C eingefroren werden. Mit 10 % Formalin, MF- oder SAF-Fixativen behandelte Stuhlproben können gekühlt (2 bis 8 °C) oder bei Zimmertemperatur (20 bis 25 °C) gelagert werden und sollten innerhalb von 2 Monaten nach der Entnahme getestet werden. In einem Cary-Blair-Transportmedium (oder einem vergleichbaren Medium) aufbewahrte Stuhlproben sollten gekühlt oder eingefroren und innerhalb einer Woche nach der Entnahme getestet werden. Stuhlproben, die konzentriert oder mit PVA-Fixativ behandelt wurden, sind für die Verwendung nicht geeignet. Stuhlproben, die von rektalen Abstrichen oder Windeln stammen, können für den ProSpecT® *Cryptosporidium* Microplate Assay verwendet werden.

HINWEISE ZUM VERFAHREN:

- Alle beiliegenden Anweisungen sorgfältig durchlesen und befolgen.
- Alle Reagenzien und Proben vor der Verwendung auf Zimmertemperatur (20 bis 25 °C) bringen.
- Reagenzien während des gesamten Verfahrens in der gleichen Reihenfolge in die Testvertiefungen pipettieren. Die Flüssigkeit in den Vertiefungen nicht mit dem Flaschenhals berühren, um eine Kontaminierung zu vermeiden.
- Die Inkubationszeit genau beachten. Nach dem Hinzufügen des Reagens in die letzte Vertiefung auf jeder zu testenden Mikrotiterplatte die Zeitmessung starten. Nie mehr als drei Platten mit 96 Vertiefungen gleichzeitig bearbeiten, um eine genaue Zeitmessung zu gewährleisten. Abweichungen von diesem Testverfahren können die Testergebnisse beeinträchtigen.

TESTVERFAHREN:

Benötigte, mitgelieferte Materialien:

| | |
|--|----------------------------|
| Reagenzien | Pipetten |
| Halterung und Abdeckung für Mikrotiterstreifen | Farbreaktion-Kurzanleitung |

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien:

| | |
|------------------------------|---|
| Behälter für Stuhlproben | Stopuhr mit Minutenmessung |
| Waschflasche für Waschpuffer | Destilliertes oder deionisiertes Wasser |

Optionale, nicht mitgelieferte Materialien:

| |
|---|
| Mikrotiterplatten-Reader für 450 nm |
| Abstrichtupfer mit Baumwoll- oder Viskosespitze |
| Mikropipette für Volumen bis zu 200 µl |
| Einwegröhrchen (Kunststoff oder Glas) |
| Vortex-Mixer mit Plattenaufsatz oder Schüttler |

Verfahren:

- Kunststoffbeutel öffnen, die erforderliche Anzahl Mikrotiterstreifen herausnehmen und in eine Halterung für Mikrotiterstreifen geben. Eine Vertiefung für die Negativkontrolle und eine Vertiefung für die Positivkontrolle verwenden. Wenn weniger als 8 Vertiefungen verwendet werden, die erforderliche Anzahl Vertiefungen von einem Streifen abbrechen und die unbenutzten Vertiefungen zurück in den Kunststoffbeutel legen. DEN BEUTEL WIEDER FEST VERSCHLIESSEN, DAMIT KEINE FEUCHTIGKEIT EINDRINGT, UND KÜHL STELLEN.
- Die Stuhlproben können direkt in die Vertiefungen gegeben oder vor dem Einfügen in die Vertiefungen in Röhrchen verdünnt werden. Zuvor verdünnte Stuhlproben sind bei Zimmertemperatur (20 bis 25 °C) bis zu 8 Stunden oder bei 2 bis 8 °C bis zu 48 Stunden haltbar und sollten dann getestet werden (siehe unten). Eine der zwei folgenden Methoden auswählen: Siehe Abschnitt A für Verdünnung in Vertiefungen und Abschnitt B für Verdünnung in Röhrchen.

A VERDÜNNUNG IN VERTIEFUNGEN

- Nicht konservierte, feste Stuhlproben:** Jeweils ein Röhrchen pro Stuhlprobe beschriften. Zu jedem Röhrchen **0,4 ml** Probenverdünnungspuffer hinzugeben. **1 Abstrichtupfer** mit Stuhlprobe benetzen und gründlich mit Probenverdünnungspuffer vermischen. So viel Flüssigkeit wie möglich herauspressen und Abstrichtupfer entsorgen. Pipette in Röhrchen platzieren.
- Konservierte oder wässrige, nicht konservierte Stuhlproben:** Die Proben durch Schütteln der Stuhlprobenbehälter mischen. Keine weitere Vorbereitung erforderlich.
- 4 Tropfen** Negativkontrolle in Vertiefung A1 geben. **4 Tropfen** Positivkontrolle in Vertiefung B1 geben.
- 100 µl** Probenverdünnungspuffer in jede Stuhlprobenvertiefung geben.
- Mithilfe von Pipetten **2 Tropfen** jeder Stuhlprobe in eine Vertiefung geben. Hinweis: Die Öffnung der Pipetten etwas in die Vertiefungen halten, um Spritzer in die angrenzenden Vertiefungen zu vermeiden.

MIT SCHRITT 8 FORTFAHREN.

B VERDÜNNUNG IN RÖHRCHEN

- Nicht konservierte, feste Stuhlproben:** Jeweils ein Röhrchen pro Stuhlprobe beschriften. Zu jedem Röhrchen **1 ml** Probenverdünnungspuffer hinzugeben. **1 Abstrichtupfer** mit Stuhlprobe benetzen und gründlich in den Probenverdünnungspuffer einmischen. So viel Flüssigkeit wie möglich herauspressen und Abstrichtupfer entsorgen. Eine Pipette in jedes Röhrchen platzieren.
- Konservierte oder wässrige, nicht konservierte Stuhlproben:** Jeweils ein Röhrchen pro Stuhlprobe beschriften. **1 ml** Probenverdünnungspuffer in jedes Röhrchen geben. Die Proben durch

Schütteln der Stuhlprobenbehälter mischen. Mithilfe von Pipetten **0,3 ml** (dritte Markierung von der Spitze der Pipette) aufziehen. Probe in die Probenverdünnung geben. Durch einmaliges Einziehen und Ausgeben mischen. Pipette im Röhrchen belassen.

Verdünnte Stuhlproben sind bei Zimmertemperatur (20 bis 25 °C) bis zu 8 Stunden oder bei 2 bis 8 °C bis zu 48 Stunden haltbar.

5. **4 Tropfen** Negativkontrolle in Vertiefung A1 geben.

6. **4 Tropfen** Positivkontrolle in Vertiefung B1 geben.

7. Mithilfe von Pipetten **0,2 ml** (zweite Markierung von der Spitze der Pipette) jeder Stuhlprobe in eine Vertiefung geben.

Hinweis: Die Öffnung der Pipetten etwas in die Vertiefungen halten, um Spritzer in die angrenzenden Vertiefungen zu vermeiden.

MIT SCHRITT 8 FORTFAHREN.

8. Die Mikrotiterplatte abdecken und bei Zimmertemperatur für (20 - 25 °C) **60 Minuten** inkubieren. Die Zeitmessung nach der Zugabe der letzten Probe starten.

9. Den Inhalt der Vertiefungen ausschütten oder absaugen. Waschen, indem jede Vertiefung mit verdünntem Waschpuffer (~350 bis 400 µl/Vertiefung) gefüllt wird. Nach jedem Waschen die gesamte Flüssigkeit aus den Vertiefungen ausschütten oder absaugen. Insgesamt **3-mal** waschen. Nach dem letzten Waschen den Inhalt ausschütten und Platte auf sauberen Papiertüchern ausklopfen oder absaugen. Soviel Waschpuffer wie möglich entfernen; die Vertiefungen dürfen jedoch niemals vollkommen trocken sein.

10. **4 Tropfen** (200 µl) Enzymkonjugat in jede Vertiefung geben.

11. Die Mikrotiterplatte abdecken und bei Zimmertemperatur für (20 - 25 °C) **30 Minuten** inkubieren.

12. Die Flüssigkeit ausschütten oder aspirieren und jede Vertiefung **5-mal** waschen (siehe Schritt 9).

13. **4 Tropfen** (200 µl) Farbsubstrat in jede Vertiefung geben.

14. Die Mikrotiterplatte abdecken und bei Zimmertemperatur für (20 - 25 °C) **10 Minuten** inkubieren.

15. **1 Tropfen** (50 µl) Stopplösung in jede Vertiefung geben. Die Vertiefungen vorsichtig schütteln oder darauf klopfen, bis sich die gelbe Farbe gleichmäßig verteilt hat. Die Reaktionen innerhalb von **10 Minuten** nach dem Hinzufügen der Stopplösung ablesen.

16. Reaktionen visuell oder bei 450 nm am Spektrophotometer ablesen.

QUALITÄTSKONTROLLE: Die Positiv- und Negativkontrollen bei jedem Testdurchlauf durchführen. Sie dienen sowohl für die Reagenzien als auch das Verfahren als Kontrolle. Die Kontrollen sollen die Reagenzien auf eindeutige Fehler hin überwachen. Die Positivkontrolle ist nicht in der Lage, ausreichende Präzision am Cut-Off-Wert des Assays zu gewährleisten.

Die optische Dichte (OD) der Negativkontrolle sollte $\leq 0,100$ bei 450 nm betragen und beim visuellen Ablesen farblos sein. Wenn in der Negativkontrolle eine gelbe Farbe vorhanden ist, die 1+ oder höher auf der Kurzanleitung entspricht, den Test unter genauer Einhaltung des Waschverfahrens wiederholen.

Die optische Dichte der Positivkontrolle sollte $\geq 0,300$ bei 450 nm betragen, nachdem die optische Dichte der Negativkontrolle subtrahiert wurde, und sollte beim visuellen Ablesen größer oder gleich der 2+-Reaktion sein. Wenn die gelbe Farbe in der Positivkontrolle geringer als 2+ der Kurzanleitung ist, technische Unterstützung hinzuziehen.

ERGEBNISSE: Für Farbinterpretationen siehe beiliegende Kurzanleitung. Visuell:

1. Die Testergebnisse durch Vergleichen mit den Reaktionsfarben der Kurzanleitung ablesen.

Positiv: gelbe Farbe mit einer Intensität von mindestens 1+

Negativ: farblos

2. Auswertung der Testergebnisse:

Positiv: Wenn sich eine gelbe Färbung mit einer Intensität von mindestens 1+ in den Testvertiefungen entwickelt, enthält die Probe CSA und der Test ist positiv.

Hinweis: Tests mit blassgelber Farbe (weniger als 1+) sollten wiederholt werden.

Negativ: Eine farblose Reaktion ist ein negatives Ergebnis und bedeutet, dass kein CSA bzw. eine nicht nachweisbare Menge an CSA in der getesteten Probe vorhanden ist.

Spektrophotometer:

1. Das Spektrophotometer (Mikrotiterplatten-Reader) zum Ablesen bei 450 nm einstellen.

2. Die optische Dichte (OD) für die Negativkontrolle ablesen.

3. Die optische Dichte der Vertiefung der Negativkontrolle von den optischen Dichten der Vertiefung der Positivkontrolle und den Testvertiefungen subtrahieren, bevor die Ergebnisse ausgewertet werden.

Hinweis: Die Reader können so eingestellt werden, dass der Leerwert gegen die Negativkontrolle gemessen wird, so dass die optische Dichte der Negativkontrolle automatisch von allen anderen Werten subtrahiert wird. Wenn der Reader nicht über diese Funktion verfügt, den Leerwert gegen Luft bestimmen und die optische Dichte der Vertiefung der Negativkontrolle von den optischen Dichten der Vertiefung der Positivkontrolle und den Testvertiefungen subtrahieren, bevor die Ergebnisse ausgewertet werden.

4. Die Testergebnisse ablesen:

Positiv: optische Dichte $\geq 0,050$ (nach Abzug des Leerwert)

(d.h. nach der Subtraktion der optischen Dichte der Negativkontrolle)

Negativ: optische Dichte $< 0,050$ (nach Abzug des Leerwert)

(d.h. nach der Subtraktion der optischen Dichte der Negativkontrolle)

5. Auswertung der spektrophotometrischen Ergebnisse:

Positiv: Wenn die optische Dichte in der Testvertiefung nach Abzug des Leerwert größer oder gleich 0,050 ist, enthält die Probe CSA und der Test ist positiv.

Negativ: Eine optischen Dichte nach Abzug des Leerwert von weniger als 0,050 ist ein negatives Ergebnis und bedeutet, dass kein oder eine nicht nachweisbare Menge an CSA in der getesteten Probe vorhanden ist.

***Hinweis:** Alle Vertiefungen, die transparent erscheinen, aber eine optische Dichte haben, die mit der visuellen Auswertung nicht übereinstimmt, sollten als abweichende Werte betrachtet werden; die Vertiefung sollte auf Blasen, kleine Partikel oder einen undurchsichtigen Film auf dem Boden der Vertiefung untersucht werden. Um diese Verunreinigungen zu entfernen, den Boden der Vertiefungen abwischen und die optische Dichte erneut ablesen. Wenn die Diskrepanz zwischen der visuellen Auswertung und der spektrophotometrischen Bestimmung der optischen Dichte fortbesteht, den Test wiederholen.

Einschränkungen: Die Zuverlässigkeit der Testergebnisse des ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay hängt davon ab, ob die Kontrollreaktionen erwartungsgemäß ablaufen. Siehe Abschnitt „Qualitätskontrolle“.

Ein negatives Testergebnis schließt nicht gänzlich aus, dass *Cryptosporidium* vorhanden ist. Dieser Fall kann eintreten, wenn die Antigenkonzentration in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt. Eine Korrelation zwischen der Antigenmenge in einer Probe und der klinischen Form konnte nicht nachgewiesen werden.

Wie bei allen diagnostischen In-Vitro-Tests sollten die Ergebnisse zusammen mit den klinischen Befunden und/oder anderen Laborwerten ausgewertet werden.

Die korrekte Durchführung der Entnahme und Verarbeitung der Stuhlprobe ist für die optimale Leistungsfähigkeit des Tests von größter Bedeutung. Optimale Testergebnisse werden mit Stuhlproben erzielt, die möglichst bald nach der Entnahme getestet werden. Siehe „Entnehmen der Stuhlproben“.

ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay wurde als sehr komplex klassifiziert.

ZU ERWARTENDE WERTE: Die Prävalenz von *Cryptosporidium*-Infektionen variiert innerhalb der verschiedenen Bevölkerungsschichten und geografischen Gebiete. In den USA beträgt die Inzidenzrate von *Cryptosporidium* ca. 0,5 bis 3,0 %, wobei die Prävalenzrate bei Kindern (12) und männlichen Homosexuellen (5, 6) höher liegt.

LEISTUNGSMERKMALE:

Sensitivität und Spezifität: Um die Leistungsfähigkeit des ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay zu bestimmen, wurden Studien durchgeführt. Die dabei verwendeten Proben stammen von großen Referenz- und Krankenhauslaboren, die parasitologische Untersuchungen durchführen. Von den insgesamt 214 Proben wurden 81 Proben mithilfe eines Säurefestigkeitstests positiv auf *Cryptosporidium* getestet; 133 Proben waren negativ. Vierzig der Proben, die beim Testen auf *Cryptosporidium* negativ ausfielen, enthielten andere Organismen als *Cryptosporidium* (Säurefestigkeit, parasitologische Untersuchung). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Folgenden aufgeführt:

| | | Säurefestigkeit | | |
|------------------------|---|-----------------|-----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpec [®] | + | 81 | 0 | 214 |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 0 | 133 | |
| | | 81 | 133 | |

Sensitivität $81/81 = 100 \%$ (95,5 - 100 %)

Spezifität $133/133 = 100 \%$ (97,3 - 100 %)

Die in Klammern angegebenen Zahlen stellen die Ergebnisse für ein Konfidenzintervall von 95 % dar.

Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit des ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay wurden klinische Studien durchgeführt. Die dafür verwendeten Proben stammten von Krankenhauslaboren und vom CDC. Die Proben stammten von symptomatischen Patienten von Gruppen normaler Prävalenz, symptomatischen Patienten von Gruppen hoher Prävalenz (HIV-positiv) und asymptomatischen Patienten aus der Ganztagsbetreuung. Die Proben lagen konserviert oder nicht konserviert in 10 % Formalin oder SAF vor. Die Proben wurden mithilfe von Säurefestigkeits- oder Immunfluoreszenz-Färbetests auf *Cryptosporidium* untersucht. Von den insgesamt 212 Proben wurden 134 Proben positiv auf *cryptosporidium*-spezifisches Antigen (CSA) getestet; 78 Proben waren negativ. Die Ergebnisse des ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay sind im Folgenden aufgeführt:

| | | Säurefestigkeit | | |
|------------------------|---|-----------------|----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpec [®] | + | 130 | 0 | 212 |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 4 | 78 | |
| | | 134 | 78 | |

Sensitivität $130/134 = 97 \%$ (92,5 - 99,2 %)

Spezifität $78/78 = 100 \%$ (95,4 - 100 %)

Die in Klammern angegebenen Zahlen stellen die Ergebnisse für ein Konfidenzintervall von 95 % dar.

An einem großen städtischen Krankenhaus wurde eine prospektive Studie durchgeführt. Dabei waren alle Proben, die über einen Zeitraum von 4 Monaten für den Säurefestigkeits-Färbetest auf *Cryptosporidium* eingereicht wurden, eingeschlossen. Die Proben wurden vor dem Test mit dem ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay nicht konserviert

bei -20 °C eingefroren. Die Ergebnisse des Anfangstests und die bereinigten Daten sind im Folgenden aufgeführt. Die Daten wurden durch das wiederholte Testen der 14 Proben, die positiv auf Säurefestigkeit und negativ auf CSA getestet wurden, bereinigt. Sechs der 14 Proben zeigten sich reproduzierbar positiv auf CSA. Spezifische Hemmtests mit Antikörpern gegen CSA zeigten in allen 6 Proben eine Hemmung von über 50 %. Diese 6 Proben gehen als richtig positive Testergebnisse in die bereinigten Daten ein.

| | | Säurefestigkeit | | Bereinigt | | |
|------------------------|---|-----------------|-----|-----------|-----|-----|
| | | + | - | + | - | |
| ProSpec [®] | + | 28 | 14 | 34 | 8 | 378 |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 1 | 335 | 1 | 335 | |
| | | 29 | 349 | 35 | 343 | |

Sensitivität $28/29 = 97 \%$ (82,2 - 99,9 %) $34/35 = 97 \%$ (85,1 - 99,9 %)
Spezifität $335/349 = 96 \%$ (93,4 - 97,8 %) $335/343 = 98 \%$ (95,5 - 99,0 %)
Die in Klammern angegebenen Zahlen stellen die Ergebnisse für ein Konfidenzintervall von 95 % dar.

Analytische Sensitivität: Mit dem ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay können etwa 20 ng/ml CSA nachgewiesen werden.

Reproduzierbarkeit: Der Inter-Assay-Variationskoeffizient des ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay wurde auf der Grundlage von 10 positiven Proben mit unterschiedlicher optischer Dichte bestimmt. Jede Probe wurde über 5 Tage in 10 Vertiefungen pro Tag getestet. Der durchschnittliche Inter-Assay-Variationskoeffizient betrug 10,6 %.

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient wurde bestimmt, indem 5 positive Proben in je 24 Vertiefungen getestet wurden. Der durchschnittliche Intra-Assay-Variationskoeffizient betrug 2,52 %.

Kreuzreaktivität: Der ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay wurde mit Stuhlproben getestet, die im Rahmen parasitologischer Untersuchungen für eine Reihe fäkaler Parasiten als positiv befunden wurden. Mit keiner der unten aufgelisteten infektiösen Agenzien konnten Kreuzreaktionen beobachtet werden.

Ascaris lumbricoides (2) *Entamoeba histolytica* (5) *Blastocystis hominis* (4)
Hymenolepis nana (2) *Endolimax nana* (3) *Iodamoeba bütschlii* (2)
Dientamoeba fragilis (4) *Entamoeba hartmanni* (2) *Isopora belli* (2)
Taenia solium (1) *Chilomastix mesnili* (1) *Strongyloides stercoralis* (2)
Entamoeba coli (6) *Giardia lamblia* (5) *Trichuris trichiura* (1)

Die Zahlen in Klammern zeigen die Anzahl der getesteten Proben an.

LITERATURVERWEISE

- Alpert, G. et al. 1986. "Outbreak of Cryptosporidiosis in a Day-Care Center". *Pediatrics* 77(2):152-157.
- Anon. 1984. "Cryptosporidiosis among children attending day-care centers - Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico". *Morbidity and Mortality Weekly Report* 33(42):599-601.
- Arrowood, M.J. and C.R. Sterling. 1989. "Comparison of Conventional Staining Methods and Monoclonal Antibody-based Methods for *Cryptosporidium* Oocyst Detection". *J. Clin. Microbiol.* 27(7):1490-1495.
- Chapman, P.A., B.A. Rush and J. McLaughlin. 1990. "An enzyme immunoassay for detecting *Cryptosporidium* in faecal and environmental samples". *J. Med. Microbiol.* 32:233-237.
- D'Antonio, R.G. et al. 1985. "A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts". *Ann. Intern. Med.* 103:886.
- Dubey, J.P., C.A. Speer and R. Fayer, eds. 1990. "Cryptosporidiosis of Man and Animals". CRC Press.
- Gallagher, M.M. et al. 1989. "Cryptosporidiosis and Surface Water". *Am. J. Public Health* 79(1):39-42.
- Hayes, E.B. et al. 1989. "Large Community Outbreak of Cryptosporidiosis Due to Contamination of a Filtered Public Water Supply". *N. Eng. J. Med.* 320(21):1372-1376.
- Leech, J.H., M.A. Sande and R.K. Root, eds. 1988. "Parasitic Infections". Churchill Livingstone.
- Navin, T.R. and A.M. Hardy. 1984. "Cryptosporidiosis in Patients with AIDS". *J. Infect. Dis.* 155:150.
- Stehr-Green, J.K. et al. 1987. "Shedding of Oocysts in Immunocompetent Individuals Infected with *Cryptosporidium*". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36(2):338-342.
- Taylor, J.P. et al. 1985. "Cryptosporidiosis Outbreak in a Day-Care Center". *Am. J. Dis. Child.* 139:1023-1025.
- Ungar, B.P. 1990. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 28:2491.

BESTELLINFORMATIONEN

ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay
24 Bestimmungen.....REF 2454024

ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay
96 Bestimmungen.....REF 2454096

Für Bestellungen sowie Kundendienst und technische Unterstützung bitte folgende Rufnummern anrufen: Remel Inc.

Hergestellt von:

Remel Inc. 12076 Santa Fe Drive, Lenexa, KS 66215, USA

Allgemeine Auskünfte **800-255-6730**

Technische Unterstützung **800-447-3641**

Bestellungen **800-447-3635**

Lokal / international **913-888-0939**

Fax lokal / international **913-888-5884**

Website: www.remel.com E-Mail: remel@remel.com



Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft:

Remel Europe Ltd.

Clipper Boulevard West, Crossways

Dartford, Kent, DA2 6PT

UK

IFU 24540E01, überarbeitet am 7. Januar 2005

Gedruckt in USA

ProSpec[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen von Remel Inc.

remel

ProSpecT® *Cryptosporidium* Microplate Assay

24/96 tests

INDICATION : Le coffret de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT® utilise des anticorps monoclonaux pour la détection qualitative de l'antigène spécifique de *Cryptosporidium* (CSA) dans les extraits aqueux de matières fécales.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST : La cryptosporidiose est depuis peu considérée presque partout dans le monde comme une maladie importante chez l'être humain (6, 9). L'agent causal, *Cryptosporidium* spp., a été identifié dans des échantillons de selles d'enfants et d'adultes dans un grand nombre de pays ainsi que dans la plupart des États américains (6). L'implication de ce parasite dans des maladies graves a été constatée aux États-Unis chez des personnes infectées par le VIH (10), dans des garderies d'enfants (1, 2, 11, 12) et dans le cas d'épidémies d'origine hydrique (5, 7, 8). Les groupes à haut risque incluent les personnes immunodéprimées, en particulier les sujets infectés par le VIH, la famille et les partenaires sexuels des patients infectés, le personnel et les enfants dans les garderies, les dresseurs d'animaux et les voyageurs (6). Les symptômes aigus de la cryptosporidiose incluent, notamment, diarrhée, crampes abdominales, nausées et vomissements, fièvre, malaise et problèmes respiratoires qui durent de quelques jours à plus d'un mois et entraînent souvent une infection persistante voire le décès des patients présentant un déficit immunitaire (6). L'infection par *Cryptosporidium* peut également être asymptomatique.

La présence d'antigènes spécifiques de *Cryptosporidium* a été détectée dans le cas d'infections par *Cryptosporidium* ; ces antigènes servent de base à des tests immunologiques par fluorescence et par capture d'antigène (3, 4, 13). Remel a identifié un antigène spécifique de *Cryptosporidium* (CSA) produit par les organismes *Cryptosporidium* au cours de leur prolifération dans le tractus intestinal hôte. Le CSA est un antigène spécifique de *Cryptosporidium* et aucune réaction croisée n'a été mise en évidence avec d'autres parasites intestinaux. Cet antigène reste stable aussi bien lors de son passage dans le tractus intestinal hôte que dans le cadre de la plupart des procédures habituelles utilisées pour recueillir et transporter les échantillons en vue de leur examen au microscope.

PRINCIPES DU TEST : Le test de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT® est un test immunologique en phase solide pour la détection du CSA. Des prélèvements de selles dilués sont ajoutés dans les puits en bandes détachables de la microplaque auxquels est fixé l'anticorps anti-CSA. Le CSA éventuellement présent est « capturé » par l'anticorps fixé. Les puits sont incubés puis lavés pour éliminer toute matière non fixée. On ajoute le conjugué enzymatique (anticorps monoclonal anti-CSA marqué avec l'enzyme peroxydase de raifort). Les puits sont incubés puis lavés pour éliminer tout conjugué non fixé. Si la réaction est positive, le CSA fixe l'enzyme dans le puits. On ajoute le substrat de l'enzyme, tétraméthylbenzidine (TMB) si la réaction est positive, l'enzyme fixée au puits par le CSA convertit le substrat en produit de réaction coloré. La fixation de la couleur peut être détectée visuellement ou à l'aide d'un spectrophotomètre. Si la réaction est négative, il n'y a pas de CSA ou il y en a trop peu pour fixer le conjugué enzymatique et aucun produit de réaction coloré ne se développe.

RÉACTIFS : Le coffret de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT® comprend suffisamment de réactifs pour effectuer de 24 à 96 tests.

| Réactifs | 24/96 tests |
|---|---|
| Microplaque* | 8 puits par bande 3 bandes/12 bandes |
| recouverte d'anticorps de lapin anti-CSA | |
| Conjugué enzymatique* | 1 flacon |
| anticorps monoclonal de souris anti-CSA | 5 ml/25 ml |
| marqué à la peroxydase contenant du sérum bovin et 0,01 % de thiomersal | |
| Contrôle positif | 1 flacon |
| extrait d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> | 4 ml |
| Contrôle négatif | 1 flacon |
| matières fécales humaines contenant 0,02 % de thiomersal | 4 ml |
| Tampon de dilution des échantillons | 1 flacon |
| solution tamponnée contenant du sérum de lapin et 0,02 % de thiomersal | 35 ml/110 ml |
| Tampon de lavage | 1 flacon |
| solution tamponnée concentrée 10x contenant 0,1 % de thiomersal | 50 ml/110 ml |
| Substrat coloré | 1 flacon |
| TMB dans le tampon | 5 ml/25 ml |
| Solution d'arrêt | 1 flacon |
| acide sulfurique 1 N (corrosif) | 6 ml |

*Remarque : Les réactifs provenant de coffrets portant des numéros de lot différents ne sont pas interchangeables.

DÉFINITION DES SYMBOLES :

| | | |
|---|--------------------|--------------------------------|
| IVD Usage diagnostique IN VITRO | LOT Lot | REF Numéro de référence |
| 2 °C - 8 °C Conservé entre 2 et 8 °C | Date de péremption | |

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS : Uniquement pour usage diagnostique IN VITRO.

1. Les réactifs sont fournis dosés prêts à l'emploi à l'exception du concentré de tampon de lavage. Ne pas diluer les réactifs sauf instruction contraire.
2. Ne pas utiliser les réactifs après les dates de péremption. Ces dates sont imprimées sur l'étiquette de chaque réactif. L'utilisation de réactifs au-delà de la date de péremption risque d'altérer la précision des résultats.
3. La contamination microbienne des réactifs peut diminuer la précision du test. Pour éviter la contamination microbienne des réactifs, utiliser des pipettes stériles à usage unique pour prélever des portions aliquotes dans les flacons de réactif.
4. Les réactifs sont préparés à partir de matériaux biologiques et doivent être considérés au cours de leur manipulation comme potentiellement infectieux. Éliminer en respectant les procédures relatives au risque.
5. Les bandes de microplaques doivent être conservées dans le sachet métallisé refermable pour protéger les puits de l'humidité.
6. Les échantillons peuvent contenir des agents potentiellement infectieux et doivent être manipulés conformément aux procédures de biosécurité de niveau 2 (BSL 2) exposées dans le manuel publié par le CDC et le NIH (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition).
7. Les prélèvements de selles doivent être complètement mélangés avant tout traitement de l'échantillon pour garantir sa parfaite représentativité. NE PAS CONCENTRER LES ÉCHANTILLONS AVANT LE TEST.
8. Le substrat coloré est sensible à l'exposition à la lumière. Tout réactif fixant la couleur lors de son exposition à la lumière doit être jeté.
9. Les opérateurs atteints de daltonisme ou de déficience visuelle peuvent avoir des difficultés à interpréter le test visuellement et doivent utiliser les mesures relevées au spectrophotomètre pour interpréter les résultats.
10. Le tampon de lavage, le tampon de dilution des échantillons, le conjugué enzymatique et les contrôles négatif contiennent du thiomersal qui est susceptible d'irriter la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer les yeux ou la peau avec de grandes quantités d'eau.
11. Jeter le tampon de lavage inutilisé dans un conteneur adapté aux produits présentant un risque biologique.
12. Le tampon de lavage (0,1 %), le tampon de dilution des échantillons (0,02 %), le conjugué enzymatique (0,01 %) et le contrôle négatif (0,02 %) contiennent du thiomersal qui est classé par les directives en vigueur de la Communauté économique européenne (CEE) comme substance dangereuse pour l'environnement (N). Les phrases de risque (phrases « R ») et conseils de sécurité (phrases « S ») suivants s'appliquent à ces produits.

N Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.
R53 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes précautions d'usage.
S35

13. La solution d'arrêt est corrosive et doit être manipulée avec précaution. Si elle entre en contact avec la peau ou les vêtements, laver à l'eau la partie souillée pendant 15 minutes. En cas de contact avec les yeux, consulter un médecin.

14. La solution d'arrêt contient 2,8 % d'acide sulfurique qui est classé par les directives en vigueur de la Communauté économique européenne (CEE) comme substance irritante (Xi). Les phrases de risque (phrases « R ») et conseils de sécurité (phrases « S ») suivants s'appliquent à ces produits.

Xi Irritant pour les yeux.
R36 Irritant pour la peau.
R38 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
S26

PRÉPARATION DES RÉACTIFS : Avant utilisation, amener tous les réactifs à température ambiante (20 à 25 °C) et mélanger doucement. Remettre les réactifs inutilisés au réfrigérateur après utilisation.

À l'exception du tampon de lavage, tous les réactifs sont fournis prêts à l'emploi dans des flacons. Les réactifs peuvent être dispensés directement à partir les flacons compte-gouttes ou versés au préalable dans des pipettes multicanaux. Si trop de réactif a été versé, l'excès doit être jeté et ne doit en aucun cas être remis dans le flacon.

Diluer au dixième le concentré de tampon de lavage 10x en ajoutant un volume de concentré à 9 volumes d'eau distillée ou déminéralisée. Le tampon de lavage dilué reste stable pendant un mois conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C.

STOCKAGE ET MANIPULATION : La date de péremption de chaque coffret est indiquée sur l'emballage. Conservé tous les composants entre 2 et 8 °C. Les bandes de microplaque inutilisées doivent être conservées dans le sachet métallisé refermable qui contient un agent dessiccateur pour éliminer l'humidité. Le substrat coloré doit être versé directement depuis le flacon protégé de la lumière fourni et doit y être conservé entre deux utilisations. Une portion aliquote de substrat coloré prélevée dans le flacon original pour quelque raison que ce soit ne doit en aucun cas y être reversée.

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS DE SELLES : Les échantillons recueillis pour une recherche de routine d'ovocytes et de parasites

peuvent être utilisés pour la détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT®. Ces échantillons doivent être placés dans des récipients en plastique propres et étanches. Les prélèvements de selles frais non traités doivent être conservés entre 2 et 8 °C et être examinés dans les 48 heures. S'il est impossible de procéder à l'examen avant 48 heures, ils doivent être congelés à une température comprise entre -20 et -70 °C. Les prélèvements de selles traités avec des fixateurs contenant 10 % de formol, de MF (merthiolate-formol) ou SAF (sodium-acétate-formol) peuvent être réfrigérés (2 à 8 °C) ou conservés à température ambiante (20 à 25 °C) et doivent être testés dans les deux mois suivant le prélèvement. Les échantillons recueillis sur un milieu de transport de Cary Blair (ou équivalent) doivent être réfrigérés ou congelés et testés dans la semaine suivant le prélèvement. Les échantillons ayant été concentrés ou traités avec des fixateurs à base de PVA (alcool polyvinyle) ne sont pas utilisables. Les échantillons recueillis sur un écouvillon rectal ou une couche sont acceptables pour la détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT®.

REMARQUES CONCERNANT LA PROCÉDURE

- Lire attentivement et suivre scrupuleusement toutes les instructions de cette notice.
- Laisser aux réactifs et aux échantillons le temps d'atteindre la température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation.
- Respecter le même ordre d'ajout des réactifs dans les puits tout au long de la procédure. Pour éviter toute contamination, ne pas toucher le liquide contenu dans les puits avec l'extrémité des flacons.
- Chronométrer chaque incubation avec précision. Commencer à compter après avoir ajouté le réactif dans le dernier puits de chaque microplaque à tester. Pour assurer la précision du chronométrage, ne pas traiter simultanément plus de trois plaques de 96 puits. Tout écart par rapport à la procédure établie risque d'altérer les performances du test.

MODE OPERATOIRE :

Éléments nécessaires fournis :

| | |
|---|---|
| Réactifs | Pipettes de transfert |
| Porte-bande de microplaque et couvercle | Fiche de procédure couleurs de réaction |

Éléments nécessaires non fournis :

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| Récipient pour prélèvements de selles | Minuteur |
| Pissette pour tampon de lavage | Eau distillée ou déminéralisée |

Éléments facultatifs non fournis :

| |
|--|
| Lecteur de microplaque compatible avec spectrophotomètre pour lecture à 450 nm |
| Cotons-tige ou écouvillons à embout recouvert de rayonne |
| Micropipette pour les volumes jusqu'à 200 µl |
| Tubes à essai à usage unique en plastique ou en verre |
| Mélangeur vortex avec adaptateur de microplaque ou agitateur-secoueur |

Procédure :

1. Ouvrir le sachet métallisé, sortir le nombre requis de bandes de microplaques et les placer sur un porte-bande de microplaque. Utiliser un puits pour le contrôle négatif et un pour le contrôle positif. Si moins de huit puits sont utilisés, détacher le nombre de puits nécessaires d'une bande et remettre les puits inutilisés dans le sachet. REFERMER LE SACHET HERMÉTIQUEMENT POUR ÉLIMINER L'HUMIDITÉ ET REMETTRE AU RÉFRIGÉRATEUR.
2. Les échantillons peuvent être ajoutés directement dans les puits ou préalablement prédiluits en tubes à essai. Les échantillons prédiluits peuvent rester à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 8 heures ou être conservés entre 2 et 8 °C pendant 48 heures avant le test (voir ci-dessous). Choisir une des deux méthodes suivantes : Voir la section A pour procéder à une dilution dans les puits ou la section B pour une pré-dilution en tubes à essai.

A DILUTION DANS LES PUIITS

3. **Échantillons solides non préservés :** Étiqueter un tube par échantillon. Ajouter **0,4 ml** de tampon de dilution des échantillons (SDB) dans chaque tube. Enduire **1 écouvillon** et mélanger vigoureusement dans le SDB. Extraire de liquide que possible et jeter l'écouvillon. Introduire une pipette de transfert dans le tube.
 4. **Échantillons préservés ou échantillons non préservés aqueux :** Mélanger en secouant les récipients pour prélèvements. Aucune autre préparation n'est nécessaire.
 5. Ajouter **4 gouttes** de contrôle négatif dans les puits A1. Ajouter **4 gouttes** de contrôle positif dans les puits B1.
 6. Ajouter **100 µl** de SDB dans chaque puits contenant un échantillon.
 7. À l'aide de pipettes de transfert, ajouter **2 gouttes** de chaque échantillon dans un puits.
- Remarque : Placer l'embout des pipettes de transfert juste à l'intérieur des puits pour éviter toute éclaboussure dans les puits adjacents.

B DILUTION EN TUBES A ESSAI

3. **Échantillons solides non préservés :** Étiqueter un tube par échantillon. Ajouter **1 ml** de tampon de dilution des échantillons (SDB) dans chaque tube. Enduire **1 écouvillon** et mélanger vigoureusement dans le SDB. Extraire de liquide que possible et jeter l'écouvillon. Introduire une pipette de transfert dans chaque tube.
4. **Échantillons préservés ou échantillons non préservés aqueux :** Étiqueter un tube par échantillon. Ajouter **1 ml** de SDB dans chaque tube. Mélanger les échantillons en secouant les récipients. À l'aide de pipettes de transfert, retirer 0,3 ml d'échantillon (troisième marque à partir de l'embout de la pipette). Expulser l'échantillon dans le SDB. Mélanger en

tirant une seule fois vers le haut puis vers le bas. Laisser les pipettes de transfert dans les tubes.

Les échantillons dilués peuvent rester à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 8 heures ou être conservés entre 2 et 8 °C pendant 48 heures.

5. Ajouter 4 gouttes de contrôle négatif dans les puits A1.

6. Ajouter 4 gouttes de contrôle positif dans les puits B1.

7. À l'aide de pipettes de transfert, ajouter 0,2 ml (deuxième marque à partir de l'embout de la pipette) de chaque échantillon dans un puits.

Remarque : Placer l'embout des pipettes de transfert juste à l'intérieur des puits pour éviter toute éclaboussure dans les puits adjacents.

PASSER À L'ÉTAPE 8

8. Couvrir la microplaque et incuber à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 60 minutes. Commencer à chronométrer une fois le dernier échantillon ajouté.

9. Vider les puits en les secouant ou en aspirant le contenu. Laver chaque puits en le remplissant complètement de tampon de lavage dilué (~350-400 µl par puits). Après chaque lavage, vider les puits de tout liquide en les secouant ou en aspirant le contenu. Au total, procéder à 3 lavages. Après le dernier lavage, éliminer tout contenu résiduel en tapotant la plaque sur des serviettes en papier propres ou par aspiration. Éliminer autant de tampon de lavage que possible sans jamais laisser les puits s'assécher complètement.

10. Ajouter 4 gouttes (200 µl) de conjugué enzymatique dans chaque puits.

11. Couvrir la microplaque et incuber à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 30 minutes.

12. Secouer avant de vider ou aspirer et laver chaque puits 5 fois comme à l'étape 9.

13. Ajouter 4 gouttes (200 µl) de substrat coloré dans chaque puits.

14. Couvrir la microplaque et incuber à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 10 minutes.

15. Ajouter 1 goutte (50 µl) de solution d'arrêt dans chaque puits. Tapoter les puits ou les vortexer légèrement jusqu'à ce que la couleur jaune soit uniforme. Lire les résultats dans les 10 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

16. Observer les réactions visuellement ou les lire au spectrophotomètre à 450 nm.

CONTRÔLE QUALITÉ : Les contrôles positif et négatif doivent être inclus dans chaque série de tests. Ils font à la fois office de contrôle des réactifs et de la procédure. Ces contrôles ont pour objet de révéler tout échec substantiel des réactifs. Le contrôle positif ne garantit pas la précision au seuil de positivité.

La densité optique (D.O.) du contrôle négatif doit être $\leq 0,100$ à 450 nm et le contrôle négatif doit être incolore à l'examen visuel. Si le contrôle négatif présente une couleur jaune d'intensité égale ou supérieure à 1+ sur la fiche de procédure, le test doit être effectué à nouveau en prêtant une attention particulière au lavage.

La D.O. du contrôle positif doit être $\geq 0,300$ à 450 nm après soustraction de celle du contrôle négatif et elle doit être égale ou supérieure à celle de la réaction 2+ dans le cas d'une observation visuelle. Si le contrôle positif présente une couleur jaune d'intensité inférieure à 2+ sur la fiche de procédure, prendre contact avec l'assistance technique.

RÉSULTATS : Consulter la fiche de procédure jointe pour l'interprétation des couleurs.

Examen visuel :

1. Observer les résultats en les comparant aux couleurs de réaction de la fiche de procédure.

Positif : couleur jaune d'intensité minimale 1+

Négatif : incolore

2. Interprétation des résultats du test :

Positif : Si une couleur jaune d'une intensité au moins égale à 1+ se développe dans le puits, l'échantillon contient du CSA et le test est positif. Remarque : Les tests présentant une couleur jaune pâle (inférieure à 1+) doivent être répétés.

Négatif : L'absence de couleur révèle un résultat négatif et indique que l'échantillon testé ne contient pas de CSA ou en contient une proportion indétectable.

Examen au spectrophotomètre :

1. Étalonner le spectrophotomètre (lecteur de microplaque) pour une lecture à 450 nm.

2. Lire la densité optique (D.O.) du contrôle négatif.

3. Retrancher la D.O. du puits contenant le contrôle négatif des D.O. mesurées dans les puits contenant le contrôle positif et dans les puits de test avant d'interpréter les résultats.

Remarque : Les lecteurs peuvent être mis à zéro à partir du contrôle négatif pour faire en sorte que la D.O. du puits le contenant soit automatiquement soustraite des autres valeurs mesurées. Si le lecteur n'a pas cette capacité, étalonner à l'air et retrancher la D.O. du puits contenant le contrôle négatif des D.O. mesurées dans les puits contenant le contrôle positif et dans les puits de test avant d'interpréter les résultats.

4. Lire les résultats du test :

Positif : D.O. $\geq 0,050$, valeur remise à zéro

(c.-à-d. après soustraction de la D.O. du contrôle négatif)

Négatif : D.O. $< 0,050$, valeur remise à zéro

(c.-à-d. après soustraction de la D.O. du contrôle négatif)

5. Interprétation des résultats enregistrés au spectrophotomètre :

Positif : Si la D.O. mesurée est supérieure ou égale à 0,050 dans le puits de test, l'échantillon contient du CSA et le test est positif.

Négatif : Une D.O. mesurée inférieure à 0,050 révèle un résultat négatif et indique que l'échantillon testé ne contient pas de CSA ou en contient une proportion indétectable.

*Remarque : Si un puits apparaissant limpide à l'examen visuel offre une lecture de D.O. ne coïncidant pas avec l'interprétation visuelle, les résultats doivent être considérés comme divergents et il faut rechercher l'existence dans les puits de bulles ou de petites particules ou la présence au fond d'un film opaque. Pour les éliminer, essuyer le fond des puits et observer à nouveau la D.O. relevée. Si la divergence persiste, répéter le test.

Limites du test : La validité des résultats de la détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT[®] dépend de la conformité de la réaction des contrôles avec les réactions attendues. Voir la section Contrôle qualité.

Un résultat de test négatif n'exclut pas la possibilité de la présence de *Cryptosporidium* et peut provenir de la présence dans l'échantillon d'un taux d'antigène inférieur au taux de détection du test. Aucune corrélation n'a été établie entre la quantité d'antigène présente dans un échantillon et la forme clinique.

Comme pour tout test de diagnostic in vitro, les résultats doivent être interprétés par le clinicien conjointement avec les observations cliniques et/ou les autres résultats de laboratoire.

La qualité du prélèvement et du traitement des échantillons est essentielle pour la précision du test. Les résultats optimaux sont obtenus sur les échantillons testés aussitôt que possible après le prélèvement. Voir la section Prélèvement des échantillons de selles.

Le coffret de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT[®] a été classé comme produit hautement complexe.

VALEURS ATTENDUES : La prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* varie en fonction des différents types de population et des zones géographiques. Aux États-Unis, la fréquence du *Cryptosporidium* est comprise entre 0,5 et 3,0 % avec une prévalence plus élevée chez les enfants (12) et dans la population homosexuelle masculine (5, 6).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE :

Sensibilité et spécificité : Des études ont été menées pour évaluer la performance du test de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT[®] sur des échantillons obtenus auprès d'un grand laboratoire de référence ayant effectué des tests sur ovocytes et parasites (O&P). Au total, 214 échantillons ont été testés ; 81 ont été reconnus positifs au *Cryptosporidium* selon la méthode de la coloration acido-résistante (AF) et 133 ont été reconnus négatifs. Quarante des échantillons négatifs pour le *Cryptosporidium* contenaient des germes autres que *Cryptosporidium* selon les tests AF ou O&P. Voici les résultats de ces évaluations :

| | | Coloration acido-résistante | | |
|------------------------|---|-----------------------------|-----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpecT [®] | + | 81 | 0 | |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 0 | 133 | |
| | | 81 | 133 | 214 |

Sensibilité 81/81 = 100 % (95,5-100 %)

Spécificité 133/133 = 100 % (97,3-100 %)

Les chiffres entre parenthèses représentent les intervalles de confiance à 95 %.

Des études cliniques ont été menées pour évaluer la performance du test de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT[®]. Les échantillons provenaient des laboratoires hospitaliers ou du CDC (Center for Disease Control, soit Centre de contrôle des maladies). Les populations de patients suivantes étaient représentées dans les groupes d'échantillons : patients symptomatiques appartenant à une population à prévalence normale, patients symptomatiques appartenant à une population à forte prévalence (sujets séropositifs pour le VIH) et patients asymptomatiques sélectionnés dans la population des garderies d'enfants. Les échantillons soumis étaient non préservés ou préservés dans une solution contenant 10 % de formol ou de SAF (sodium-acétate-formol). La présence de *Cryptosporidium* dans les échantillons a été testée selon la méthode de la coloration acido-résistante (AF) ou par immunofluorescence (IFA). Au total, 212 échantillons ont été testés ; 134 ont été reconnus positifs pour l'antigène spécifique de *Cryptosporidium* (CSA) et 78 ont été reconnus négatifs. Les résultats du test de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT[®] sont présentés ci-dessous :

| | | Coloration acido-résistante | | |
|------------------------|---|-----------------------------|----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpecT [®] | + | 130 | 0 | |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 4 | 78 | |
| | | 134 | 78 | 212 |

Sensibilité 130/134 = 97 % (92,5-99,2 %)

Spécificité 78/78 = 100 % (95,4-100 %)

Les chiffres entre parenthèses représentent les intervalles de confiance à 95 %.

Un essai prospectif a été mené dans un grand hôpital d'un centre urbain. Tous les échantillons soumis à un test de détection de *Cryptosporidium* par coloration acido-résistante pendant une période de 4 mois ont été inclus dans l'étude. Les échantillons étaient non préservés et congelés à -20 °C avant le test de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT[®]. Les résultats du test initial les données résolues sont

présentés ci-dessous. Les données ont été résolues par répétition du test sur les 14 échantillons AF négatifs/CSA positifs. Pour six sur quatorze, la positivité au CSA était reproductible. Les tests par inhibition spécifique des anticorps du CSA ont révélé une inhibition supérieure à 50 % pour les six. Ces 6 échantillons sont considérés comme vrais positifs dans la résolution des données ci-dessous.

| | | Coloration acido-résistante | | Données résolues | |
|------------------------|---|-----------------------------|-----|------------------|-----|
| | | + | - | + | - |
| ProSpecT [®] | + | 28 | 14 | 34 | 8 |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 1 | 335 | 1 | 335 |
| | | 29 | 349 | 35 | 343 |
| | | | | | 378 |

Sensibilité 28/29 = 97 % (82,2-99,9 %)

Spécificité 335/349 = 96 %

(93,4-97,8 %)

Les chiffres entre parenthèses représentent les intervalles de confiance à 95 %.

Sensibilité analytique : Le test de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT[®] permet de détecter environ 20 nanogrammes/ml de CSA.

Reproductibilité : Le coefficient de variation entre tests du coffret de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque a été évalué en sélectionnant 10 échantillons positifs présentant des mesures de densité optiques variables. Chaque échantillon a été testé dans 10 puits par jour pendant cinq jours de suite. Le C.V. moyen entre tests était de 10,6 %.

Le C.V. moyen intra-test a été évalué en testant 24 puits avec chacun des 5 échantillons positifs. Le C.V. moyen intra-test était de 2,52 %.

Réactivité croisée : Le test de détection de *Cryptosporidium* sur microplaque ProSpecT[®] a été soumis à des tests portant sur des prélèvements de selles O&P positifs pour un certain nombre de parasites fécaux. Aucune réaction croisée n'a été observée avec les agents infectieux dont la liste suit.

| | | |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Ascaris lumbricoides</i> (2) | <i>Entamoeba histolytica</i> (5) | <i>Blastocystis hominis</i> (4) |
| <i>Hymenolepis nana</i> (2) | <i>Endolimax nana</i> (3) | <i>Iodamoeba butschlii</i> (2) |
| <i>Dientamoeba fragilis</i> (4) | <i>Entamoeba hartmanni</i> (2) | <i>Isoospora belli</i> (2) |
| <i>Taenia solium</i> (1) | <i>Chlamydomonas mesnili</i> (1) | <i>Strongyloides stercoralis</i> (2) |
| <i>Entamoeba coli</i> (6) | <i>Giardia lamblia</i> (5) | <i>Trichuris trichiura</i> (1) |

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'échantillons testés.

BIBLIOGRAPHIE

- Alpert, G. et al. 1986. "Outbreak of Cryptosporidiosis in a Day-Care Center." *Pediatrics* 77(2):152-157.
- Anon. 1984. "Cryptosporidiosis among children attending day-care centers - Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico." *Morbidity and Mortality Weekly Report* 33(42):599-601.
- Arrowood, M.J. and C.R. Sterling. 1989. "Comparison of Conventional Staining Methods and Monoclonal Antibody-based Methods for *Cryptosporidium* Oocyst Detection." *J. Clin. Microbiol.* 27(7):1490-1495.
- Chapman, P.A., B.A. Rush and J. McLaughlin. 1990. "An enzyme immunoassay for detecting *Cryptosporidium* in faecal and environmental samples." *J. Med. Microbiol.* 32:233-237.
- D'Antonio, R.G. et al. 1985. "A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts." *Ann. Intern. Med.* 103:886.
- Dubey, J.P., C.A. Speer and R. Fayer, eds. 1990. "Cryptosporidiosis of Man and Animals." CRC Press.
- Gallaher, M.M. et al. 1989. "Cryptosporidiosis and Surface Water." *Am. J. Public Health* 79(1):39-42.
- Hayes, E.B. et al. 1989. "Large Community Outbreak of Cryptosporidiosis Due to Contamination of a Filtered Public Water Supply." *N. Eng. J. Med.* 320(21):1372-1376.
- Leech, J.H., M.A. Sande and R.K. Root, eds. 1988. "Parasitic Infections." Churchill Livingstone.
- Navin, T.R. and A.M. Hardy. 1984. "Cryptosporidiosis in Patients with AIDS." *J. Infect. Dis.* 155:150.
- Stehr-Green, J.K. et al. 1987. "Shedding of Oocysts in Immunocompetent Individuals Infected with *Cryptosporidium*." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36(2):338-342.
- Taylor, J.P. et al. 1985. "Cryptosporidiosis Outbreak in a Day-Care Center." *Am. J. Dis. Child.* 139:1023-1025.
- Ungar, B.L. 1990. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 28:2491.

POUR COMMANDER

Détection de *Cryptosporidium* sur microplaque

ProSpecT[®] coffret de 24 tests.....RÉF. 2454024

Détection de *Cryptosporidium* sur microplaque

ProSpecT[®] coffret de 96 tests.....RÉF. 2454096

Pour passer une commande ou pour contacter le service clientèle ou l'assistance technique, appeler: Remel Inc.

Fabriqué par:

Remel Inc. 12076 Santa Fe Drive, Lenexa, KS 66215, États-Unis

Renseignements généraux **800-255-6730**

Services techniques **800-447-3641**

Commandes **800-447-3635**

Local/International **913-888-0939**

Local/International, télécopie **913-888-5884**

Site Web: www.remel.com E-mail: remel@remel.com



Mandataire dans la Communauté européenne:

Remel Europe Ltd.

Clipper Boulevard West, Crossways

Dartford, Kent, DA2 6PT

UK

IFU 24540FR01, révisé le 7 janvier 2005

Imprimé aux États-Unis

ProSpecT[®] est une marque déposée de Remel Inc.



ProSpecT® *Cryptosporidium* Microplate Assay

24/96 pruebas

USO PREVISTO: El análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpecT® utiliza anticuerpos monoclonales para la detección cualitativa del antígeno específico de *Cryptosporidium* (AEC) en extractos acuosos de muestras fecales.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA: La criptosporidiosis se ha reconocido recientemente como una enfermedad intestinal humana importante en la mayor parte del mundo (6, 9). El agente causal, *Cryptosporidium* spp., se ha identificado en muestras de heces de niños y adultos de muchos países y en la mayoría de estados de los Estados Unidos (6). Este parásito está implicado en afecciones graves de personas infectadas por el VIH (10), centros de día (1, 2, 11, 12) y brotes de origen acuoso (5, 7, 8) en los Estados Unidos. Los grupos de un riesgo en particular son las personas inmunocomprometidas, en especial con infección por el VIH, miembros de la familia y parejas de los pacientes infectados, niños y cuidadores de guarderías, manipuladores de animales y viajeros (6). Los síntomas agudos de criptosporidiosis consisten en diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómitos, fiebre, malestar general y problemas respiratorios que duran entre varios días y más de un mes, y que a menudo provocan una infección persistente o la muerte en pacientes con déficit inmunológico (6). La infección por *Cryptosporidium* también puede ser asintomática.



Los antígenos específicos de *Cryptosporidium* se han encontrado asociados con las infecciones por *Cryptosporidium* y se han usado como base de inmunoanálisis de fluorescencia y de captura antigénica (3, 4, 13). Remel ha identificado un antígeno específico de *Cryptosporidium* (AEC) que se produce en estos microorganismos cuando se multiplican en el tracto intestinal del huésped. El antígeno es específico de *Cryptosporidium* y no se ha comprobado que tenga reacciones cruzadas con otros parásitos entéricos. El antígeno es estable para el transporte por el tracto intestinal en el que se aloja y en la mayoría de los procedimientos de rutina utilizados para recoger y transportar muestras para el examen microscópico.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO: El análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpecT es un inmunoanálisis en fase sólida para la detección del AEC. Las muestras de materia fecal diluidas se añaden a los pocillos separables de la microplaca a los que se encuentra ligado el anticuerpo anti-AEC. Si hay AEC en la muestra, el mismo es "capturado" por el anticuerpo ligado. Los pocillos se incuban y posteriormente se lavan para eliminar el material no ligado. Se añade el conjugado enzimático (anticuerpo anti-AEC monoclonal marcado con enzima peroxidasa de rábano). Los pocillos se incuban y posteriormente se lavan para eliminar el conjugado no ligado. Si la reacción es positiva, el AEC liga el conjugado enzimático al pocillo. Se añade el sustrato para la enzima, TMB. Si la reacción es positiva, la enzima ligada al pocillo por el AEC convierte el sustrato en un producto de reacción de color que puede detectarse a simple vista o mediante una espectrofotometría. Si la reacción es negativa, no hay AEC presente o su concentración es insuficiente para ligar el conjugado enzimático y no se desarrolla ningún producto de reacción de color.

REACTIVOS: El análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpecT incluye reactivos suficientes para realizar 24 ó 96 pruebas.

| Reactivos | 24/96 pruebas |
|--|------------------------|
| Microplaca* | 8 pocillos/tira |
| Recubierta con anticuerpos anti-AEC de conejo | 3 tiras/12 tiras |
| Conjugado enzimático* | 1 frasco |
| Anticuerpo monoclonal de ratón anti-AEC, marcados con peroxidasa, y con contenido de suero bovino y timerosal al 0,01% | 5 ml/25 ml |
| Control positivo | 1 frasco |
| Extracto de oocitos de <i>cryptosporidium</i> | 4 ml |
| Control negativo | 1 frasco |
| Materia fecal humana con timerosal al 0,02% | 4 ml |
| Tampón de dilución de la muestra | 1 frasco |
| Solución tamponada con suero de conejo y timerosal al 0,02% | 35 ml/110 ml |
| Tampón de lavado | 1 frasco |
| Solución tampón concentrada 10x con timerosal al 0,1% | 50 ml/110 ml |
| Sustrato de color | 1 frasco |
| TMB en tampón | 5 ml/25 ml |
| Solución de paro | 1 frasco |
| Ácido sulfúrico 1,0 N (corrosivo) | 6 ml |

*Nota: No intercambie los reactivos entre estuches con diferentes números de lote.

| DEFINICIONES DE SÍMBOLOS | LOT | REF | Número de catálogo |
|--|---|-----|--------------------|
|  8 °C |  | | |
| 2 °C | Almacenar a 2-8 °C | | Fecha de caducidad |

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES: Sólo para uso diagnóstico *IN VITRO*.

- Los reactivos se suministran en concentraciones listas para usar, a excepción del concentrado de tampón de lavado. No diluya los reactivos, salvo en los casos en que se indique.
- No usar los reactivos después de su fecha de caducidad. Las fechas de caducidad se encuentran impresas en la etiqueta de cada reactivo. Su uso después de esta fecha puede comprometer la exactitud de los resultados.
- La contaminación microbiana de los reactivos puede reducir la exactitud del análisis. Evite la contaminación utilizando pipetas desechables estériles cuando extraiga las alícuotas de los frascos de reactivo.
- Los reactivos están preparados con materiales biológicos y deben considerarse potencialmente infecciosos durante su manipulación. Deben desecharse siguiendo los procedimientos adecuados para residuos con riesgo biológico.
- Las tiras de microplaca deben guardarse en la bolsa de aluminio resellable para proteger de la humedad los pocillos de las microplacas.
- Las muestras pueden contener agentes potencialmente infecciosos y deben manipularse en el Nivel 2 de bioseguridad, según las recomendaciones del manual publicado por los CDC/NIH, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en laboratorios de microbiología y biomedicina), 4th Edition.
- Las muestras de materia fecal deben mezclarse bien antes de procesarlas para asegurar una representación exacta de la muestra. NO CONCENTRE LAS MUESTRAS ANTES DE REALIZAR EL ANÁLISIS.
- El sustrato de color es sensible a la exposición a la luz. Si el reactivo se expone a la luz y toma color, debe desecharse.
- Es posible que las personas daltónicas o con deficiencias visuales no puedan leer los resultados del análisis. En estos casos, los resultados se interpretarán mediante espectrofotometría.
- El tampón de lavado, el tampón de dilución de la muestra, el conjugado enzimático, el control negativo contienen timerosal, el cual puede producir irritación en la piel, los ojos y las membranas mucosas. En caso de contacto, lávese los ojos o la piel con agua abundante.
- Deseche el tampón de lavado usado, en recipientes adecuados para residuos con riesgo biológico.
- El tampón de lavado (0,1%), el tampón de dilución de la muestra (0,02%), el conjugado enzimático (0,01%) y el control negativo (0,02%) contienen timerosal, que está clasificado según las directivas de la Unión Europea (UE) correspondientes como sustancia peligrosa para el medio ambiente (N). Las siguientes son las frases apropiadas que reflejan los Riesgos (R) y la Seguridad de uso (S).



N
R53 Puede causar efectos adversos a largo plazo en el medio acuático.
S35 Este material y su envase deben desecharse de forma segura.



Xi
R36 Irritante para los ojos
R38 Irritante para la piel
S26 En caso de contacto con los ojos, aclarar inmediatamente con agua abundante y buscar asistencia médica.

- La solución de paro es corrosiva y debe manipularse con cuidado. Si esta solución entra en contacto con la piel o con la ropa, debe lavarse la zona afectada con agua durante 15 minutos. En caso de contacto con los ojos, busque atención médica.
- La solución de paro contiene ácido sulfúrico al 2,8%, el cual está clasificado según las directivas aplicables de la Unión Europea (UE) como sustancia irritante (Xi). Las siguientes son las frases apropiadas que reflejan los Riesgos (R) y la Seguridad de uso (S).



Xi
R36 Irritante para los ojos
R38 Irritante para la piel
S26 En caso de contacto con los ojos, aclarar inmediatamente con agua abundante y buscar asistencia médica.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS: Antes de utilizarlos, lleve todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25 °C) y mézclelos con cuidado. Los reactivos no utilizados deben devolverse a la temperatura de refrigeración después de su uso.

Todos los reactivos, a excepción del tampón de lavado, se suministran listos para usar en frascos. Los reactivos pueden aplicarse directamente de los frascos o con pipetas multicanales. Si se ha extraído una cantidad excesiva de reactivo, la cantidad sobrante debe desecharse. No vuelva a colocarla en el frasco.

Diluya el tampón de lavado de concentración 10x a una concentración de 1x añadiendo 1 parte de concentrado por cada 9 partes de agua destilada o desionizada. El tampón de lavado diluido es estable durante 1 mes cuando se almacena a 2-8 °C.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN: La fecha de caducidad de cada estuche figura en la etiqueta del envase. Almacene todos los componentes a una temperatura de 2-8 °C. Las tiras de microplaca no utilizadas deben guardarse en la bolsa de aluminio que contiene un agente desecante para evitar la humedad. El sustrato de color debe guardarse y usarse en el frasco con protección contra la luz en que se suministra. Si se extrae una alícuota del frasco original por cualquier razón, no vuelva a colocar el sustrato de color no utilizado en el frasco original.

RECOGIDA DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL: Para el análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpecT® pueden utilizarse las muestras recogidas para exámenes habituales de H&P. Las muestras de materia fecal deben recogerse en recipientes plásticos limpios con cierre hermético. Las muestras frescas sin tratar deben guardarse a 2-8 °C y utilizarse antes de 48 horas. Si no se puede realizar el análisis dentro de este tiempo, deben congelarse a una temperatura de -20 a -70 °C. Las muestras de materia fecal tratadas con formalina al 10% o fijadores MF

o SAF pueden refrigerarse (2-8 °C) o guardarse a temperatura ambiente (20-25 °C) y deben utilizarse dentro de los 2 meses a partir de su obtención. Las muestras de materia fecal recogidas en medios de transporte Cary Blair (o equivalentes) deben refrigerarse o congelarse y utilizarse en la semana siguiente a su obtención. Las muestras de materia fecal que se han concentrado o tratado con fijadores PVA no son aptas para su uso. Las muestras de materia fecal obtenidas a través de hisopos rectales y pañales son aptas para el análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpecT®.

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- Lea y siga con atención las instrucciones incluidas en este folleto.
- Deje que todos los reactivos y muestras se establezcan a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de utilizarlos.
- Añada los reactivos a los pocillos de análisis en el mismo orden durante todo el procedimiento. Para evitar su contaminación, no toque el líquido de los pocillos con las puntas del frasco.
- Mida el tiempo de cada incubación con exactitud, comenzando después de añadir el reactivo al último pocillo de cada microplaca. Para asegurar una medición exacta, no procese más de tres microplacas de 96 pocillos a la vez. Cualquier desviación respecto del procedimiento establecido podría alterar la precisión del análisis.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA:

Material necesario que se suministra:

| | |
|---|--|
| Reactivos | Pipetas de transferencia |
| Soporte y cubierta para tiras de microplaca | Tarjeta de procedimiento con colores de reacción |

Material necesario pero no suministrado:

| | |
|--|------------------------------|
| Recipientes de recogida de las muestras de heces | Minutero |
| Frasco de lavado para el tampón de lavado | Agua destilada o desionizada |

Material opcional no suministrado:

Lector de microplacas capaz de leer 450 nm o
Palillos aplicadores con punta de algodón o rayón
Micropipeta capaz de dispensar volúmenes hasta 200 µl
Tubos de ensayo desechables de plástico o vidrio
Mezclador de vórtice con adaptador o agitador para microplacas

Procedimiento:

- Abra la bolsa de aluminio, retire la cantidad requerida de tiras de microplaca y colóquelas en un soporte adecuado. Utilice un pocillo para el control negativo y otro para el control positivo. Si utiliza menos de 8 pocillos, separe la cantidad requerida de pocillos de una tira y vuelva a guardar los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio. VUELVA A SELLAR BIEN LA BOLSA PARA IMPEDIR LA ENTRADA DE HUMEDAD Y VUELVA A PONERLA EN EL FRIGORÍFICO.
- Las muestras pueden añadirse directamente en los pocillos o diluirse previamente en tubos. Las muestras previamente diluidas pueden mantenerse a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 8 horas o a 2-8 °C durante 48 horas antes de realizar el análisis (ver a continuación). Elija uno de los dos métodos siguientes: Véase el recuadro A para la dilución en pocillos y el recuadro B para la dilución previa en los tubos.

A DILUCIÓN EN POCILLOS

- Muestras sólidas sin conservante:** Etiquete un tubo para cada muestra. Añada **0,4 ml** de tampón de dilución de la muestra a cada tubo. Recubra **1 hisopo** con la muestra y mezcle con fuerza en el tampón. Exprima la mayor cantidad de líquido posible y deseche el hisopo. Coloque una pipeta de transferencia en el tubo.
- Muestras con conservante o muestras acuosas sin conservante:** Mezcle agitando los recipientes de recogida de las muestras. No se requiere ninguna preparación adicional.
- Añada **4 gotas** de control negativo al pocillo A1. Añada **4 gotas** de control positivo al pocillo B1.
- Añada **100 µl** de tampón de dilución a cada pocillo de muestra.
- Utilizando pipetas de transferencia, añada **2 gotas** de cada muestra a cada pocillo de muestra.

Nota: Coloque la abertura de las pipetas de transferencia dentro de los pocillos para evitar derramar la muestra a los pocillos adyacentes.

SIGA CON EL PASO 8

B DILUCIÓN EN TUBOS

- Muestras sólidas sin conservante:** Etiquete un tubo para cada muestra. Añada **1 ml** de tampón de dilución de la muestra a cada tubo. Recubra **1 hisopo** con la muestra y agite con fuerza en el tampón. Exprima la mayor cantidad de líquido posible y deseche el hisopo. Coloque una pipeta de transferencia en cada tubo.
- Muestras con conservante o muestras acuosas sin conservante:** Etiquete un tubo para cada muestra. Añada **1 ml** de tampón de dilución de la muestra a cada tubo. Mezcle agitando los recipientes de recogida de las muestras. Utilizando las pipetas de transferencia, extraiga **0,3 ml** (tercera marca desde la punta de la pipeta). Vierta la muestra en el tampón. Mezcle tirando hacia arriba y hacia abajo una sola vez. Deje las pipetas de transferencia en los tubos.

Las muestras diluidas pueden mantenerse durante 8 horas a temperatura ambiente (20-25 °C) o 48 horas a 2-8 °C.

- Añada **4 gotas** de control negativo al pocillo A1.
- Añada **4 gotas** de control positivo al pocillo B1.
- Utilizando las pipetas de transferencia, añada **0,2 ml** (segunda marca

desde la punta de la pipeta) de cada muestra a un pocillo.

Nota: Coloque la abertura de las pipetas de transferencia dentro de los pocillos para evitar derramar la muestra a los pocillos adyacentes.

SIGA CON EL PASO 8

8. Cubra la microplaca e incube a temperatura ambiente (20-25 °C) durante **60 minutos**. Comience a medir el tiempo después de añadir la última muestra.

9. Sacuda o aspire el contenido de los pocillos. Lave los pocillos llenándolos bien con tampón de lavado diluido (~350 – 400 µl/pocillo). Sacuda o aspire todo el líquido de los pocillos después de cada lavado. Lávelos **3 veces**. Después del último lavado, elimine el contenido y golpee la placa sobre toallas de papel limpias o aspire. Elimine la mayor cantidad de tampón de lavado posible pero no deje que los pocillos se sequen completamente en ningún momento.

10. Añada **4 gotas** (200 µl) de conjugado enzimático a cada pocillo.

11. Cubra la microplaca e incube a temperatura ambiente (20-25 °C) durante **30 minutos**.

12. Sacuda y aspire o lave cada pocillo **5 veces** como en el paso 9.

13. Añada **4 gotas** (200 µl) de sustrato de color a cada pocillo.

14. Cubra la microplaca e incube a temperatura ambiente (20-25 °C) durante **10 minutos**.

15. Añada **1 gota** (50 µl) de solución de paro a cada pocillo. Golpee suavemente o agite en vórtice los pocillos hasta que el color amarillo quede uniforme. Lea las reacciones antes de **10 minutos** tras añadir la solución de paro.

16. Lea a simple vista o mediante espectrofotometría a 450 nm.

CONTROL DE CALIDAD: Los controles positivo y negativo deben incluirse cada vez que se realiza el análisis, y actúan como controles del reactivo y del procedimiento. Su objetivo es monitorizar cualquier fallo importante del reactivo. El control positivo no garantiza la precisión en el punto de corte del análisis.

La densidad óptica (D.O.) del control negativo debe ser $\leq 0,100$ a 450 nm y es incolora cuando se lee a simple vista. Si el control negativo tiene un color amarillo de intensidad igual a 1+ o mayor según la tarjeta de procedimiento, debe repetirse el ensayo prestando especial atención al procedimiento de lavado.

La densidad óptica del control positivo debe ser $\geq 0,300$ a 450 nm, después de restar la densidad óptica del control negativo y debe ser igual o mayor que la reacción 2+ o mayor cuando se lee a simple vista. Si el control positivo tiene un color amarillo de una intensidad menor que 2+ según la tarjeta de procedimiento, solicite asistencia técnica.

RESULTADOS: Consulte la tarjeta de procedimiento que se adjunta para interpretar los colores.

Lectura a simple vista:

1. Lea los resultados del análisis comparándolos con los colores de reacción de la tarjeta de procedimiento.

Positivo: color amarillo de intensidad 1+ como mínimo

Negativo: incoloro

2. Interpretación de los resultados de la prueba:

Positivo: Si se forma un color amarillo de intensidad 1+ como mínimo en el pocillo de la muestra, ésta contiene AEC y la prueba es positiva.

Nota: Las pruebas con color amarillo pálido (menos de 1+) deben repetirse.

Negativo: El resultado es negativo si la reacción es incolora, lo que indica que no hay AEC presente en la muestra o que su concentración no es detectable.

Lectura espectrofotométrica:

1. Configure el espectrofotómetro (lectora de microplaca) para una lectura a 450 nm.

2. Lea la densidad óptica del control negativo.

3. Reste la densidad óptica del pocillo de control negativo de la lectura de densidad óptica del pocillo de control positivo y de los pocillos de las muestras antes de interpretar los resultados.

Nota: Los lectores pueden ponerse en cero a partir del pocillo de control negativo para que la densidad óptica del control negativo se reste automáticamente de todas las demás lecturas. Si el lector no ofrece esta capacidad, ajuste frente a aire y reste la densidad óptica del pocillo de control negativo de las lecturas de densidad óptica del pocillo de control positivo y de los pocillos de las muestras antes de interpretar los resultados.

4. Lea los resultados del análisis:

Positivo: D.O. $\geq 0,050$ valor restado del blanco

(es decir, después de restar la D.O. del control negativo)

Negativo: D.O. $< 0,050$ valor restado del blanco

(es decir, después de restar la D.O. del control negativo)

5. Interpretación de los resultados espectrofotométricos:

Positivo: Si la lectura de D.O. igual o superior a 0,050 en el pocillo de la muestra, ésta contiene AEC y la prueba es positiva.

Negativo: Una lectura de D.O. inferior a 0,050 es un resultado negativo e indica que no hay AEC en la muestra o que su concentración no es detectable.

* **Nota:** Los pocillos que son transparentes a simple vista pero cuya lectura de D.O. no es coherente con la interpretación a simple vista deben considerarse como discrepantes y examinarse para determinar si contienen burbujas, partículas pequeñas o una película opaca en su fondo. Para eliminar las burbujas o partículas, limpie el fondo de los pocillos y lea la D.O. nuevamente. Si la discrepancia entre las lecturas a

simple vista y de D.O. persiste, repita el análisis.

Limitaciones del procedimiento: La validez de los resultados obtenidos con el análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpec[®] depende de que la reacción de control tenga el resultado esperado. Consulte el apartado Control de Calidad.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de la presencia de *Cryptosporidium* y puede aparecer cuando la concentración de antígenos en la muestra es inferior al grado de detección del análisis. No se ha establecido una correlación entre la cantidad de antígeno en una muestra y la presentación clínica.

Al igual que en todos los métodos de diagnóstico *IN VITRO*, el médico debe interpretar los resultados junto con los hallazgos clínicos y otros resultados de laboratorio.

La recogida y procesamiento correctos de las muestras son fundamentales para obtener la máxima precisión en el análisis. Para obtener resultados óptimos, la prueba debe realizarse lo antes posible después de obtener las muestras. Consulte la sección Recogida de muestras de materia fecal.

La prueba de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpec[®] se ha clasificado como un análisis de gran complejidad.

VALORES ESPERADOS: La prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* varía según la población y el área geográfica. En los EE.UU., la incidencia del *Cryptosporidium* es aproximadamente del 0,5 al 3,0% con tasas de prevalencia mayores en los niños (12) y en la población homosexual masculina (5,6).

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO:

Sensibilidad y especificidad: Los estudios se realizaron para evaluar el comportamiento del análisis de *Cryptosporidium* ProSpec[®] con muestras obtenidas en laboratorios de referencia grandes y laboratorios hospitalarios que realizan el estudio de H&P. Se analizaron en total 214 muestras sin conservante; 81 dieron un resultado positivo de *Cryptosporidium* con tinción ácidoresistente (AR) y 133, un resultado negativo. Cuarenta de las muestras negativas a *Cryptosporidium* contenían microorganismos distintos de *Cryptosporidium* en el estudio con AR o H&P. Los resultados de estas evaluaciones se muestran a continuación:

| | | Ácidoresistente | | |
|------------------------|---|-----------------|-----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpec [®] | + | 81 | 0 | 214 |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 0 | 133 | |
| | | 81 | 133 | |

Sensibilidad 81/81 = 100% (95,5-100%)

Especificidad 133/133 = 100% (97,3-100%)

Los números entre paréntesis son intervalos de confianza al 95%.

Se han realizado estudios clínicos para evaluar el rendimiento del análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpec[®]. Las muestras se obtuvieron en laboratorios hospitalarios y en los CDC. Las poblaciones de pacientes representados en la mezcla de muestras eran pacientes sintomáticos de una población de prevalencia normal, pacientes sintomáticos de una población de prevalencia alta (VIH positivos) y pacientes asintomáticos procedentes de un centro de día. Las muestras se enviaron sin conservante o conservadas con formalina al 10% o SAF. En las muestras se estudió el *Cryptosporidium* con métodos de tinción ácidoresistente (AR) o con inmunofluorescencia (IFA). Se analizaron en total 212 muestras sin conservante; 134 dieron un resultado positivo al antígeno específico (AEC) de *Cryptosporidium* en las pruebas y 78, un resultado negativo. Los resultados del análisis en microplaca *Cryptosporidium* de ProSpec[®] se presentan a continuación:

| | | Ácidoresistente | | |
|------------------------|---|-----------------|----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpec [®] | + | 130 | 0 | 212 |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 4 | 78 | |
| | | 134 | 78 | |

Sensibilidad 130/134 = 97% (92,5-99,2%)

Especificidad 78/78 = 100% (95,4-100%)

Los números entre paréntesis son intervalos de confianza al 95%.

Se realizó un ensayo clínico prospectivo en un gran hospital metropolitano. Se incluyeron en el estudio todas las muestras enviadas para tinción ácidoresistente de *Cryptosporidium* en un periodo de 4 meses. No se añadió conservante a las muestras, que se congelaron a -20 °C antes del estudio con el análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpec[®]. Los resultados del estudio inicial y los datos resueltos se presentan a continuación. Los datos se resolvieron repitiendo el estudio de 14 muestras con tinción AR negativa/AEC positivo. Seis de las catorce muestras dieron sistemáticamente resultado positivo al AEC. Los estudios de inhibición superior al 50% específica con anticuerpo frente al AEC demostraron una inhibición superior al 50% en las 6 muestras. Estas 6 muestras se consideraron positivos verdaderos en los datos resueltos.

| | | Ácidoresistente | | Resuelto | | |
|------------------------|---|-----------------|-----|----------|-----|-----|
| | | + | - | + | - | |
| ProSpec [®] | + | 28 | 14 | 34 | 8 | 378 |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 1 | 335 | 1 | 335 | |
| | | 29 | 349 | 35 | 343 | |

Sensibilidad 28/29 = 97% (82,2-99,9%) 34/35 = 97% (85,1-99,9%)

Especificidad 335/349 = 96% (93,4-97,8%) 335/343 = 98% (95,5-99,0%)

Los números entre paréntesis son intervalos de confianza al 95%.

Sensibilidad analítica: El análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpec[®] detecta aproximadamente 20 nanogramos/ml de AEC.

Reproducibilidad: El coeficiente de variación (CV) interanálisis del análisis de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpec[®] se evaluó seleccionando 10 muestras positivas con lecturas variables de densidad óptica. Cada muestra se estudió en 10 pocillos cada día, durante cinco días. La media del CV interanálisis fue de 10,6%.

El CV intranálisis se evaluó estudiando cada una de las 5 muestras positivas con 24 pocillos. La media del CV intranálisis fue del 2,52%.

Reactividad cruzada: El ensayo de *Cryptosporidium* en microplaca ProSpec[®] se ha estudiado con muestras de materia fecal positivas para una serie de parásitos fecales. No se observó reactividad cruzada alguna con ninguno de los agentes infecciosos que se enumeran a continuación.

| | | |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Ascaris lumbricoides</i> (2) | <i>Entamoeba histolytica</i> (5) | <i>Blastocystis hominis</i> (4) |
| <i>Hymenolepis nana</i> (2) | <i>Endolimax nana</i> (3) | <i>Iodamoeba butschlii</i> (2) |
| <i>Dientamoeba fragilis</i> (4) | <i>Entamoeba hartmanni</i> (2) | <i>Isospora belli</i> (2) |
| <i>Taenia solium</i> (1) | <i>Chilomastix mesnili</i> (1) | <i>Strongyloides stercoralis</i> (2) |
| <i>Entamoeba coli</i> (6) | <i>Giardia lamblia</i> (5) | <i>Trichuris trichiura</i> (1) |

Los números entre paréntesis indican los números de muestras estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alpert, G. et al. 1986. "Outbreak of Cryptosporidiosis in a Day-Care Center." Pediatrics 77(2):152-157.
- Anon. 1984. "Cryptosporidiosis among children attending day-care centers - Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico." Morbid. Mortal. Weekly Rep. 33(42):599-601.
- Arrowood, M.J. and C.R. Sterling. 1989. "Comparison of Conventional Staining Methods and Monoclonal Antibody-based Methods for *Cryptosporidium* Oocyst Detection." J. Clin. Microbiol. 27(7):1490-1495.
- Chapman, P.A., B.A. Rush and J. McLaughlin. 1990. "An enzyme immunoassay for detecting *Cryptosporidium* in faecal and environmental samples." J. Med. Microbiol. 32:233-237.
- D'Antonio, R.G. et al. 1985. "A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts." Ann. Intern. Med. 103:886.
- Dubey, J.P., C.A. Speer and R. Fayer, eds. 1990. "Cryptosporidiosis of Man and Animals." CRC Press.
- Gallaher, M.M. et al. 1989. "Cryptosporidiosis and Surface Water." Am. J. Public Health 79(1):39-42.
- Hayes, E.B. et al. 1989. "Large Community Outbreak of Cryptosporidiosis Due to Contamination of a Filtered Public Water Supply." N. Eng. J. Med. 320(21):1372-1376.
- Leech, J.H., M.A. Sande and R.K. Root, eds. 1988. "Parasitic Infections." Churchill Livingstone.
- Navin, T.R. and A.M. Hardy. 1984. "Cryptosporidiosis in Patients with AIDS." J. Infect. Dis. 155:150.
- Stehr-Green, J.K. et al. 1987. "Shedding of Oocysts in Immunocompetent Individuals Infected with *Cryptosporidium*." Am. J. Trop. Med. 1 Hyg 36(2):338-342.
- Taylor, J.P. et al. 1985. "Cryptosporidiosis Outbreak in a Day-Care Center." Am. J. Dis. Child. 139:1023-1025.
- Ungar, B.P. 1990. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. J. Clin. Microbiol., 28:2491.

PEDIDOS

Análisis de *Cryptosporidium* en microplacaREF. 2454024

ProSpec[®] Estuche de 24 pruebas

Análisis de *Cryptosporidium* en microplacaREF. 2454096

ProSpec[®] Estuche de 96 pruebas

Para realizar pedidos o si necesita asistencia al cliente o técnica, llame a: Remel Inc.

Fabricado por:

Remel Inc.

12076 Santa Fe Drive, Lenexa, KS 66215, EE.UU.

Información general

800-255-6730

Servicios técnicos

800-447-3641

Pedidos

800-447-3635

Local / Internacional

913-888-0939

Fax local/Internacional

913-888-5884



Dirección en Internet: www.remel.com

email: remel@remel.com

Representante autorizado en la Comunidad Europea:

Remel Europe Ltd.

Clipper Boulevard West, Crossways

Dartford, Kent, DA2 6PT

UK

IFU 24540ES01, revisado el 7 de enero de 2005

Impreso en EE.UU.

ProSpec[®] es una marca registrada de Remel Inc.

remel

ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay

Kit da 24 o 96 test

FINALITÀ D'USO: ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay utilizza anticorpi monoclonali per la determinazione qualitativa dell'antigene specifico del *Cryptosporidium* (CSA) in estratti acquosi di campioni fecali.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DELLA METODICA: Si ritiene che la criptosporidiosi abbia avuto recentemente notevole rilevanza come importante patologia dell'uomo nella maggior parte dei paesi del mondo (6, 9). L'agente eziologico, *Cryptosporidium* spp., è stato individuato nei campioni fecali di bambini e adulti in molti paesi e stati degli Stati Uniti (6). Questo parassita è stato riconosciuto responsabile di gravi malattie in persone infette da HIV (10), centri di accoglienza (1, 2, 11, 12) ed epidemie trasmesse con l'acqua (5, 7, 8) negli Stati Uniti. I gruppi particolarmente esposti al rischio di contagio comprendono le persone immunocompromesse, specialmente quelle con l'infezione dell'HIV, i membri delle famiglie e i partner sessuali dei pazienti infetti, bambini e il personale didattico di asili o scuole, addestratori di animali e persone che viaggiano (6). I sintomi della criptosporidiosi acuta possono includere diarrea, dolori addominali, nausea, vomito, febbre, malessere e problemi respiratori, che possono perdurare per diversi giorni fino a più di un mese e spesso portare a infezioni persistenti o addirittura al decesso in pazienti con difese immunitarie carenti (6). Le infezioni da *Cryptosporidium* possono anche decorrere asintomatiche.

Gli antigeni specifici anti *Cryptosporidium* si ritrovano associati alle infezioni da *Cryptosporidium* e costituiscono l'elemento di base dei saggi immunologici fluorescenti per la cattura dell'antigene (3, 4, 13). Remel ha individuato l'antigene specifico del *Cryptosporidium* (CSA) prodotto dagli organismi del *Cryptosporidium* durante la fase di moltiplicazione nel tratto intestinale dell'ospite. L'antigene è specifico rispetto al *Cryptosporidium* e non sono stati riscontrati casi di reazione crociata con altri parassiti intestinali. L'antigene si mantiene stabile sia durante il percorso nel tratto intestinale dell'ospite, sia durante i trattamenti di raccolta e trasporto cui di routine vengono sottoposti i campioni da sottoporre ad esame microscopico.



PRINCIPI DEL METODO: ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay è un saggio immunologico in fase solida per la determinazione di CSA. I campioni fecali diluiti vengono aggiunti a pozzetti isolati di una micropiastra rivestiti con l'anticorpo anti-CSA. Se è presente il CSA, questo viene "catturato" dall'anticorpo che riveste il pozzetto. I pozzetti sono posti in incubazione e, successivamente, il materiale non legato viene rimosso mediante lavaggio. Si aggiunge quindi il coniugato enzimatico (anticorpo monoclonale anti-CSA coniugato con enzima perossidasi estratto da radice di rafano). I pozzetti sono posti in incubazione e, successivamente, il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. In caso di reazione positiva, il CSA lega l'enzima al pozzetto. Si aggiunge quindi il substrato cromogeno per l'enzima (TMB). In caso di reazione positiva, l'enzima fissato al pozzetto dal CSA converte il substrato dando luogo ad una reazione colorata. Lo sviluppo del colore può essere determinato visivamente o mediante spettrofotometria. Con una reazione negativa non è presente CSA, o è presente ad una concentrazione insufficiente per consentire il legame con il coniugato enzimatico e quindi non si osserva alcuna reazione colorimetrica.

REAGENTI: ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay contiene reagenti sufficienti ad eseguire 24 o 96 test.

| Reagenti | Kit da 24 / 96 test |
|--|--------------------------------|
| Micropiastra* | 8 pozzetti per striscia |
| Rivestita con anticorpi di coniglio anti-CSA | 3 o 12 strisce |
| Coniugato enzimatico* | 1 fialone |
| Anticorpo monoclonale anti-CSA di topo coniugato con perossidasi, siero bovino e 0,01% timerosal | 5 ml o 25 ml |
| Campione di controllo positivo | 1 fialone |
| Estratto di oocisti del <i>Cryptosporidium</i> | 4 ml |
| Campione di controllo negativo | 1 fialone |
| Materiale fecale umano con 0,02% di timerosal | 4 ml |
| Soluzione tampone per diluizione del campione | 1 fialone |
| Soluzione tampone con siero di coniglio e 0,02% timerosal | 35 ml o 110 ml |
| Soluzione tampone di lavaggio | 1 fialone |
| Soluzione tampone concentrata 10x con 0,1% timerosal 50 ml o 110 ml | |
| Substrato cromogeno | 1 fialone |
| TMB in soluzione tampone | 5 ml o 25 ml |
| Soluzione bloccante | 1 fialone |
| Acido solforico 1,0 N (corrosivo) | 6 ml |
| *Nota: non scambiare alcun reagente di un kit con altri con differente numero di lotto. | |


INTERPRETAZIONE DEI SIMBOLI:

IVD Per uso diagnostico **LOTTO** Lotto **CODICE** Codice
IN VITRO

 Conservare a 2-8°C
 Data di scadenza


AVVERTENZE E PRECAUZIONI: Esclusivamente per uso diagnostico IN VITRO.

- I reagenti sono già diluiti in modo ottimale, ad eccezione della soluzione tampone di lavaggio che è concentrata. Non diluire i reagenti, salvo nei casi in cui ciò sia espressamente indicato.
- Non utilizzare reagenti scaduti. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ciascun reagente. L'uso di reagenti scaduti può influire negativamente sull'accuratezza dei risultati.
- La contaminazione batterica dei reagenti può ridurre la precisione del saggio. Per evitare la contaminazione batterica dei reagenti utilizzare pipette sterili monouso.
- I reagenti sono preparati con materiali biologici e quindi devono essere trattati come prodotti potenzialmente infettivi. Smaltirli secondo le procedure di prevenzione e protezione dagli agenti biologici.
- Le strisce della micropiastra devono essere conservate all'interno della busta sigillabile per salvaguardare i pozzetti della micropiastra dall'umidità.
- I campioni possono contenere agenti potenzialmente infettivi e quindi devono essere maneggiati come agenti biologici di gruppo 2 come indicato nella guida CDC/NIH, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4th Edition (D.L. 626/94 Titolo VII per l'Italia).
- I campioni di feci devono essere accuratamente mescolati prima della procedura, per garantire un campione rappresentativo. **NON SOTTOPORRE I CAMPIONI A PROCEDURE DI CONCENTRAZIONE PRIMA DEL SAGGIO.**
- Il substrato cromogeno è sensibile alla luce. Se il reagente è stato esposto alla luce ed appare colorato deve essere scartato.
- Le persone daltoniche o con difetti alla vista possono non essere in grado di leggere il risultato ad occhio nudo e devono quindi utilizzare uno spettrofotometro per l'interpretazione dei risultati.
- La soluzione tampone di lavaggio, la soluzione tampone per la diluizione del campione, il coniugato enzimatico, i campioni di controllo negativi contengono tutti timerosal, una sostanza che può irritare la cute, gli occhi e le mucose. In caso di contatto, lavare gli occhi e la cute con abbondante quantità di acqua.
- Smaltire la soluzione tampone di lavaggio in appositi contenitori per rifiuti contaminati.
- La soluzione tampone di lavaggio (0,1%), la soluzione tampone per diluizione del campione (0,02%), il coniugato enzimatico (0,01%) e il campione di controllo negativo (0,02%) contengono timerosal, sostanza classificata come dannosa per l'ambiente (N) dalle pertinenti direttive CEE. Quelle seguenti sono le frasi appropriate concernenti il rischio (R) e la sicurezza(S).

N  R53
S35
Può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico.
Questo prodotto ed il suo recipiente devono essere manipolati con cautela.

13. La soluzione bloccante è corrosiva e deve essere maneggiata con cautela. Se tale soluzione viene a contatto con la cute o gli indumenti, lavare la zona contaminata con acqua per 15 minuti. In caso di contatto con gli occhi, consultare il medico.

14. La soluzione bloccante contiene acido solforico al 2,8%, sostanza classificata come irritante (Xi) dalle pertinenti direttive CEE. Quelle seguenti sono le frasi appropriate concernenti il rischio (R) e la sicurezza (S).

Xi  R36
R38
S26
Irritante per gli occhi
Irritante per la cute
In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente ed abbondantemente con acqua e consultare il medico.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI: Prima dell'uso, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) e agitarli delicatamente. Dopo l'uso rimettere in frigorifero i reagenti non utilizzati.

Tutti i reagenti, ad eccezione della soluzione tampone di lavaggio, sono pronti per l'uso e forniti in fialoni. I reagenti possono essere dispensati direttamente dal fialone contagocce oppure mediante una pipetta automatica multicannale. Se si preleva troppo reagente, la quantità in eccesso deve essere scartata. Non rimettere il reagente in eccesso nel fialone.

Diluire 1 parte di soluzione tampone concentrata di lavaggio 10x con 9 parti di acqua distillata o deionizzata. Il tampone diluito è stabile per 1 mese e deve essere conservato a 2 - 8°C.

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ: La data di scadenza di ciascun kit è indicata sull'etichetta della confezione. Conservare tutti i componenti a 2 - 8°C. Le strisce della micropiastra non utilizzate devono essere conservate nella busta protettiva metallizzata contenente essiccante di protezione contro l'umidità. Il substrato cromogeno deve essere conservato e dispensato direttamente dal fialone originale, dove è protetto dalla luce. Se per qualsiasi motivo si rimuove un'aliquota dal contenitore originale, l'eventuale substrato cromogeno non utilizzato non deve essere rimosso nel fialone.

RACCOLTA DEI CAMPIONI DI FECE: Per l'esecuzione del test con ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay non è necessario apportare alcuna modifica alle tecniche di raccolta dei campioni fecali abitualmente impiegate in laboratorio per l'esame parassitologico tradizionale. I

campioni fecali devono essere prelevati utilizzando contenitori di plastica puliti ed a prova di perdite. I campioni fecali freschi e non trattati devono essere conservati a 2 - 8°C ed esaminati entro 48 ore. Se i campioni fecali freschi non possono essere esaminati entro 48 ore, essi devono essere congelati ad una temperatura compresa fra -20 e -70°C. I campioni fecali fissati con formalina al 10%, con MF o SAF possono essere refrigerati (2 - 8°C) o conservati a temperatura ambiente (20 - 25°C) ed esaminati entro 2 mesi dal prelievo. I campioni fecali raccolti in Cary Blair o in equivalenti terreni di trasporto per coprocultura devono essere refrigerati o congelati ed esaminati entro una settimana dal prelievo. I campioni fecali sottoposti a concentrazione o trattati con fissativo PVA (alcool polivinilico) non sono idonei per questo test. I campioni fecali prelevati mediante tampone rettale o da pannolini per neonato possono essere utilizzati con ProSpec[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay.

NOTE PROCEDURALI

- Leggere e seguire attentamente le istruzioni riportate su questo foglio illustrativo.
- Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (20 - 25°C).
- Nel corso dell'intera procedura, aggiungere i reagenti ai pozzetti in esame utilizzando sempre lo stesso ordine. Per evitare contaminazioni, non toccare il fluido contenuto nei pozzetti con l'estremità del fialone contagocce.
- Controllare accuratamente la durata di ciascuna incubazione. Iniziare il conteggio del tempo dopo aver aggiunto il reagente all'ultimo pozzetto su ciascuna delle piastre in esame. Per garantire tempi corretti, trattare non più di tre piastre da 96 pozzetti per volta. Ogni scostamento dalla procedura stabilita può alterare la performance del saggio.

PROCEDIMENTO :

Materiali compresi nel kit:

| | |
|--|--|
| Reagenti | Pipette |
| Supporto per le strisce della micropiastra e coperchio | Scheda grafica di procedura con scala cromatica di riferimento |

Materiali aggiuntivi richiesti per l'esecuzione del test:

| | |
|---|--------------------------------|
| Contenitori per la raccolta dei campioni fecali | Cronometro timer |
| Spruzzetta per la soluzione tampone di lavaggio | Acqua distillata o deionizzata |

Materiali opzionali non forniti:

Letto per micropiastre capace di leggere a 450 nm
Tamponcini applicatori con punta in cotone o rayon
Micropipette da 200 µl
Provette monouso in plastica o vetro
Vortex con adattatore per piastre o agitatore

Procedura:

- Aprire la confezione, prelevare il numero necessario di strisce dalla micropiastra e porle nell'apposito supporto. Utilizzare un pozzetto per il campione di controllo negativo ed uno per il campione di controllo positivo. Se si utilizzano meno di 8 pozzetti, staccare da una striscia il numero di pozzetti necessario e riporre i pozzetti inutilizzati nella busta protettiva. **RISIGILLARE ERMETICAMENTE LA BUSTA PER PROTEGGERE DALL'UMIDITÀ E RIPORLA IN FRIGORIFERO.**
- I campioni possono essere aggiunti direttamente nei pozzetti o diluiti in provetta, prima di essere aggiunti ai pozzetti. Prima di essere esaminati, i campioni prediluiti possono essere mantenuti a temperatura ambiente (20 - 25°C) per 8 ore o a 2 - 8°C per 48 ore (cfr. in seguito). Scegliere uno di questi due metodi: Fare riferimento al paragrafo **A** per la diluizione nei pozzetti; fare riferimento al paragrafo **B** per la prediluizione in provetta.

A DILUIZIONE NEI POZZETTI

3. Campioni solidi non conservati in fissativo: Etichettare una provetta per ciascun campione. Aggiungere **0,4 ml** di soluzione tampone per diluizione (SDB) a ciascuna provetta. Ricoprire **1 tamponcino** con il campione e mescolare accuratamente nella soluzione SDB. Strizzare bene il tampone, scaricando quanto più fluido possibile ed eliminarlo. Inserire una pipetta nella provetta.

4. Campioni conservati in fissativo o acquosi non conservati: Mescolare agitando i contenitori utilizzati per la raccolta dei campioni. Non è necessaria alcuna preparazione ulteriore.

5. Aggiungere **4 gocce** di campione di controllo negativo al pozzetto A1. Aggiungere **4 gocce** di campione di controllo positivo al pozzetto B1.

6. Aggiungere **100 µl** di SDB a ciascun pozzetto contenente un campione.

7. Utilizzando le pipette fornite, aggiungere **2 gocce** di ciascun campione al relativo pozzetto.

Nota: porre il puntale della pipetta esattamente all'interno di ogni pozzetto per prevenire la formazione di schizzi che contaminerebbero i pozzetti adiacenti.

PROCEDERE CON IL PUNTO B

B DILUIZIONE NELLE PROVETTE

- 3. Campioni solidi non conservati in fissativo:** Etichettare una provetta per ciascun campione. Aggiungere **1 ml** di soluzione tampone per diluizione (SDB) a ciascuna provetta. Ricoprire **1 tamponcino** con il campione e mescolare accuratamente nella soluzione SDB. Strizzare bene il tampone, scaricando quanto più fluido possibile ed eliminarlo. Inserire una pipetta in ciascuna provetta.
- 4. Campioni conservati in fissativo o acquosi non conservati:**

Etichettare una provetta per ciascun campione. Aggiungere **1 ml** di soluzione SDB a ciascuna provetta. Mescolare i campioni agitando i contenitori utilizzati per la raccolta. Utilizzando le pipette fornite, prelevare **0,3 ml** (terza tacca dalla punta della pipetta). Dispensare il campione nella soluzione SDB. Mescolare il campione prelevandolo e rimettendolo nella provetta una sola volta. Lasciare le pipette nelle rispettive provette.

I campioni diluiti possono essere conservati per 8 ore a temperatura ambiente (20 - 25°C) o per 48 ore a 2 - 8°C.

5. Aggiungere **4 gocce** di campione di controllo negativo al pozzetto A1.
6. Aggiungere **4 gocce** di campione di controllo positivo al pozzetto B1.
7. Utilizzando le pipette fornite, distribuire **0,2 ml** (seconda tacca dalla punta della pipetta) di ciascun campione al relativo pozzetto.

Nota: porre il puntale della pipetta esattamente all'interno di ogni pozzetto per prevenire la formazione di schizzi che contaminerebbero i pozzetti adiacenti.

PROCEDERE CON IL PUNTO 8

8. Coprire la micropietra e incubarla a temperatura ambiente (20 - 25°C) per **60 minuti**. Far partire il timer dopo aver aggiunto l'ultimo campione.
9. Decantare o aspirare il contenuto dei pozzetti. Eseguire un lavaggio riempiendo completamente ciascun pozzetto con soluzione tampone di lavaggio **diluita** (~350-400 µl per pozzetto). Dopo ciascun lavaggio decantare o aspirare tutto il fluido contenuto nei pozzetti. Eseguire in totale **3 lavaggi**. Dopo l'ultimo lavaggio rimuovere tutto il liquido dai pozzetti mediante aspirazione e sbattere delicatamente la piastra su carta assorbente pulita. Svotare quanto più possibile i pozzetti, ma porre molta attenzione che gli stessi non si asciugino completamente.
10. Aggiungere a ciascun pozzetto **4 gocce** (200 µl) di coniugato enzimatico.
11. Coprire la micropietra e incubarla a temperatura ambiente (20 - 25°C) per **30 minuti**.
12. Agitare ed aspirare, poi eseguire **5 lavaggi** in ogni pozzetto, come riportato al punto 9.
13. Aggiungere a ciascun pozzetto **4 gocce** (200 µl) di substrato cromogeno.
14. Coprire la micropietra e incubarla a temperatura ambiente (20 - 25°C) per **10 minuti**.
15. Aggiungere a ciascun pozzetto **1 goccia** (50 µl) di soluzione bloccante. Picchiare delicatamente o passare su Vortex i pozzetti fino ad ottenere una colorazione gialla uniforme. Leggere i risultati entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione bloccante.
16. Leggere i risultati a occhio nudo o mediante spettrofotometro a 450 nm.

CONTROLLO DI QUALITÀ: È necessario includere i campioni di controllo positivi e negativi ogni volta che si esegue il test. I campioni di controllo positivi e negativi sono utilizzati per il controllo di qualità sia della procedura che della validità del test. I campioni di controllo sono previsti per evidenziare eventuali perdite di efficacia dei reagenti. Il campione di controllo positivo non garantisce la precisione del valore di cut-off del test.

La densità ottica (D.O.) del campione di controllo negativo deve risultare $\leq 0,100$ a 450 nm, risultando incolore quando la lettura è effettuata ad occhio nudo. Se il campione di controllo negativo mostra una colorazione gialla corrispondente o superiore al valore 1+ di riferimento, riportato sulla scheda grafica di procedura, è necessario ripetere l'esame ponendo particolare attenzione alla accurata esecuzione della procedura di lavaggio.

La D.O. del campione di controllo positivo deve risultare $\geq 0,300$ a 450 nm, dopo aver sottratto la D.O. del campione di controllo negativo. A occhio nudo deve risultare pari o superiore al valore 2+ della scheda interpretativa. Se il campione di controllo positivo produce una colorazione meno intensa del valore 2+, contattare il servizio di assistenza tecnica.

RISULTATI: Per l'interpretazione dei risultati colorimetrici, fare riferimento alla scala cromatica di riferimento della scheda grafica di procedura inclusa nel kit.

Letture ad occhio nudo:

1. Leggere il risultato del test confrontando il colore del pozzetto con quelli riportati sulla scala cromatica di riferimento della scheda grafica di procedura.

Risultato positivo: colorazione gialla di intensità almeno pari a 1+

Risultato negativo: nessuna colorazione

2. Interpretazione dei risultati del test:

Risultato positivo: se nel pozzetto in esame si sviluppa colore giallo d'intensità almeno pari a 1+, il campione contiene il CSA ed il risultato è positivo.

Nota: i test con colore giallo pallido (inferiori a 1+) devono essere ripetuti.

Risultato negativo: una reazione senza produzione di colore costituisce un risultato negativo ed indica l'assenza del CSA o la sua presenza ad una concentrazione non rilevabile nel campione esaminato.

Letture mediante spettrofotometro:

1. Regolare lo spettrofotometro (lettore di micropiastre) per effettuare la lettura a 450 nm.

2. Leggere la densità ottica (D.O.) del campione di controllo negativo.
 3. Sottrarre la D.O. del pozzetto del campione di controllo negativo alla D.O. del pozzetto del campione di controllo positivo e dei pozzetti dei campioni in esame prima di procedere con l'interpretazione dei risultati.
- Nota: lo spettrofotometro può essere azzerato sul pozzetto del campione di controllo negativo: in tal modo la D.O. del pozzetto del campione di controllo negativo sarà automaticamente sottratta da quella di tutte le altre letture.

Se lo spettrofotometro non consente questa regolazione, azzerare contro aria e, prima di procedere con l'interpretazione dei risultati, sottrarre il valore del pozzetto del campione di controllo negativo dai valori del

pozzetto del campione di controllo positivo e dei pozzetti dei campioni in esame.

4. Leggere i risultati dei test:

Risultato positivo: D.O. di $\geq 0,050$ dopo azzeramento (ovvero dopo aver sottratto la D.O. del campione di controllo negativo)

Risultato negativo: D.O. di $< 0,050$ dopo azzeramento (ovvero dopo aver sottratto la D.O. del campione di controllo negativo)

5. Interpretazione dei risultati (lettura mediante spettrofotometro):

Risultato positivo: se nel pozzetto in esame il valore di D.O. dopo azzeramento è pari o maggiore a 0,050, il campione contiene CSA ed il risultato è positivo.

Risultato negativo: una D.O. dopo azzeramento inferiore a 0,050 costituisce un risultato negativo ed indica l'assenza di CSA o la sua presenza ad una concentrazione non rilevabile nel campione esaminato.

***Nota:** le letture sui pozzetti con un aspetto apparentemente incolore ma che forniscono un valore di D.O. che contrasta con la lettura ad occhio nudo devono essere considerate incongruenti ed i pozzetti in questione devono essere ricontrollati per rilevare l'eventuale presenza di bollicine, di particelle in sospensione o di patina opaca sull'estremità inferiore del pozzetto stesso. Per eliminare questi elementi di disturbo, pulire l'estremità inferiore dei pozzetti ed effettuare nuovamente la lettura della D.O. Se la discordanza tra la lettura ad occhio nudo ed il valore di D.O. persiste, il test deve essere ripetuto.

Limiti della procedura: la validità dei risultati con ProSpec[™] *Cryptosporidium* Microplate Assay è confermata se la reazione del campione di controllo fornisce il risultato atteso (Cfr. la sezione: "Controllo Qualità").

Un risultato negativo non esclude completamente la presenza di *Cryptosporidium*, ciò si verifica quando il livello di antigene presente nel campione è inferiore alla soglia di sensibilità del test. Non è stata dimostrata alcuna correlazione tra quantità di antigene nel campione e quadro clinico.

Come per tutti gli altri test diagnostici IN VITRO, i risultati devono essere interpretati dal medico specialista, tenendo conto del quadro clinico e/o dei risultati di altri esami di laboratorio.

Un corretto prelievo ed un appropriato trattamento del campione sono essenziali per ottenere prestazioni ottimali con questo test. I risultati sono tanto più affidabili quanto più rapidamente il campione è trattato dopo il prelievo (Cfr. la sezione: "Raccolta dei campioni di feci").

ProSpec[™] *Cryptosporidium* Microplate Assay è stato classificato come test estremamente complesso.

RISULTATI ATTESI: La diffusione delle infezioni causate da *Cryptosporidium* varia secondo le differenti popolazioni ed aree geografiche. Negli Stati Uniti, l'incidenza di *Cryptosporidium* è pari a circa lo 0,5 - 3,0%, con tassi di diffusione più elevati tra i bambini (12) e tra i maschi omosessuali (5,6).

CARATTERISTICHE DEL METODO:

Sensibilità e specificità: Sono stati condotti vari studi clinici per valutare la precisione di ProSpec[™] *Cryptosporidium* Microplate Assay con i campioni ottenuti da importanti laboratori di riferimento e ospedali che hanno eseguito gli esami parassitologici. Sono stati esaminati 214 campioni; 81 dei quali sono risultati positivi a *Cryptosporidium* tramite la prova acido-resistente (AF), mentre 133 sono risultati negativi. Quaranta campioni con risultato negativo del *Cryptosporidium* contenevano organismi diversi dal *Cryptosporidium* tramite prova AF o esame parassitologico. I risultati di queste valutazioni vengono riportati di seguito:

| | | Acido-resistente | | |
|------------------------|---|------------------|-----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpec [™] | + | 81 | 0 | |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 0 | 133 | |
| | | 81 | 133 | 214 |

Sensibilità 81/81 = 100% (95,5 - 100%)

Specificità 133/133 = 100% (97,3 - 100%)

I numeri tra parentesi rappresentano gli intervalli di confidenza al 95%.

Sono stati condotti vari studi clinici per valutare la precisione di ProSpec[™] *Cryptosporidium* Microplate Assay. I campioni sono stati ottenuti da laboratori ospedalieri e i CDC (centri di accoglienza). Le categorie di pazienti rappresentate nel gruppo di campioni erano costituite da pazienti sintomatici con diffusione normale, pazienti sintomatici con diffusione elevata (HIV positivo) e pazienti asintomatici in cura giornaliera. I campioni sono stati conservati in fissativo o non conservati in formalina o SAF al 10%. I campioni sono stati sottoposti a test per il *Cryptosporidium* sia tramite la prova acido-resistente (AF) che con quella della colorazione immunofluorescente (IFA). Sono stati esaminati 214 campioni; 81 dei quali sono risultati positivi all'antigene specifico del *Cryptosporidium* (CSA) mentre 78 sono risultati negativi. I risultati con il ProSpec[™] *Cryptosporidium* Microplate Assay vengono presentati di seguito:

| | | Acido-resistente | | |
|------------------------|---|------------------|----|-----|
| | | + | - | |
| ProSpec [™] | + | 130 | 0 | |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 4 | 78 | |
| | | 134 | 78 | 212 |

Sensibilità 130/134 = 97% (92,5 - 99,2%)

Specificità 78/78 = 100% (95,4 - 100%)

I numeri tra parentesi rappresentano gli intervalli di confidenza al 95%.

È stata condotta una prova prospettica in un grande ospedale

metropolitano. Tutti i campioni esaminati per la colorazione acido-resistente del *Cryptosporidium* durante un periodo di 4 mesi sono stati compresi nello studio. I campioni non contenevano conservanti e sono stati congelati a -20°C prima di effettuare il test con il ProSpec[™] *Cryptosporidium* Microplate Assay. I risultati dei test iniziali e i dati risolti vengono presentati di seguito. I dati sono stati risolti dopo le ripetizioni del test dei 14 campioni con AF negativo/CSA positivo. Sei dei quattordici sono risultati positivi al CSA in modo riproducibile. Studi sui test di inibizione specifica con l'anticorpo anti-CSA hanno mostrato una inibizione maggiore del 50% in tutti i 6 campioni. Questi 6 campioni vengono considerati veramente positivi nei dati risolti.

| | | Acido-resistente | | Risolti | |
|------------------------|---|------------------|-----|---------|-----|
| | | + | - | + | - |
| ProSpec [™] | + | 28 | 14 | 34 | 8 |
| <i>Cryptosporidium</i> | - | 1 | 335 | 1 | 335 |
| | | 29 | 349 | 35 | 343 |
| | | | | 378 | |

Sensibilità 28/29 = 97% (82,2 - 99,9%) 34/35 = 97% (85,1 - 99,9%)

Specificità 335/349 = 96% (93,4 - 97,8%) 335/343 = 98% (95,5% - 99,0%)

I numeri tra parentesi rappresentano gli intervalli di confidenza al 95%.

Sensibilità analitica: Il ProSpec[™] *Cryptosporidium* Microplate Assay rivela circa 20 nanogrammi/ml di CSA.

Riproducibilità: Il coefficiente di variazione inter-analisi del ProSpec[™] *Cryptosporidium* Microplate Assay è stato valutato scegliendo 10 campioni con risultato positivo con densità ottiche diverse. Ciascun campione è stato esaminato in 10 pozzetti al giorno per cinque giorni. Il CV medio inter-analisi è stato del 10,6%.

Il CV intra-analisi è stato valutato sottoponendo a test 24 pozzetti con ciascuno dei 5 campioni con risultato positivo. Il CV medio intra-analisi è stato del 2,52%.

Reattività crociata: Il ProSpec[™] *Cryptosporidium* Microplate Assay è stato valutato utilizzando campioni fecali positivi all'esame parassitologico per numerosi parassiti fecali. Non è stata osservata alcuna reattività crociata con gli agenti infettivi di seguito elencati.

Ascaris lumbricoides (2) *Entamoeba histolytica* (5) *Blastocystis hominis* (4)
Hymenolepis nana (2) *Endolimax nana* (3) *Iodamoeba butschlii* (2)
Dientamoeba fragilis (4) *Entamoeba hartmanni* (2) *Isoospora belli* (2)
Taenia solium (1) *Chilomastix mesnili* (1) *Strongyloides stercoralis* (2)
Entamoeba coli (6) *Giardia lamblia* (5) *Trichuris trichiura* (1)

I numeri fra parentesi indicano il numero di campioni esaminati.

BIBLIOGRAFIA

1. Alpert, G. et al. 1986. "Outbreak of Cryptosporidiosis in a Day-Care Center." *Pediatrics* 77(2):152-157.
2. Anon. 1984. "Cryptosporidiosis among children attending day-care centers - Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico." *Morbidity and Mortality Weekly Report* 33(42):599-601.
3. Arrowood, M.J. and C.R. Sterling. 1989. "Comparison of Conventional Staining Methods and Monoclonal Antibody-based Methods for *Cryptosporidium* Oocyst Detection." *J. Clin. Microbiol.* 27(7):1490-1495.
4. Chapman, P.A., B.A. Rush and J. McLaughlin. 1990. "An enzyme immunoassay for detecting *Cryptosporidium* in faecal and environmental samples." *J. Med. Microbiol.* 32:233-237.
5. D'Antonio, R.G. et al. 1985. "A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts." *Ann. Intern. Med.* 103:886.
6. Dubey, J.P., C.A. Speer and R. Fayer, eds. 1990. "Cryptosporidiosis of Man and Animals." CRC Press.
7. Gallaher, M.M. et al. 1989. "Cryptosporidiosis and Surface Water." *Am. J. Public Health* 79(1):39-42.
8. Hayes, E.B. et al. 1989. "Large Community Outbreak of Cryptosporidiosis Due to Contamination of a Filtered Public Water Supply." *N. Eng. J. Med.* 320(21):1372-1376.
9. Leech, J.H., M.A. Sande and R.K. Root, eds. 1988. "Parasitic Infections." Churchill Livingstone.
10. Navin, T.R. and A.M. Hardy. 1984. "Cryptosporidiosis in Patients with AIDS." *J. Infect. Dis.* 155:150.
11. Stehr-Green, J.K. et al. 1987. "Shedding of Oocysts in Immunocompetent Individuals Infected with *Cryptosporidium*." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36(2):338-342.
12. Taylor, J.P. et al. 1985. "Cryptosporidiosis Outbreak in a Day-Care Center." *Am. J. Dis. Child.* 139:1023-1025.
13. Ungar, B.P. 1990. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 28:2491.

PRESENTAZIONE

Kit da 24 test ProSpec[™] *Cryptosporidium* ...CODICE 2454024

Microplate Assay

Kit da 96 test ProSpec[™] *Cryptosporidium* ...CODICE 2454096

Microplate Assay

Per effettuare ordini o richiedere assistenza tecnica fare riferimento a: Remel Inc.

Prodotto da:

Remel Inc. 12076 Santa Fe Drive, Lenexa, KS 66215, USA

Informazioni generali **800-255-6730**

Assistenza tecnica **800-447-3641**

Accettazione ordini **800-447-3635**

Contatto locale/internazionale **913-888-0939**

Fax locale/internazionale **913-888-5884**

Sito web: www.remel.com Indirizzo posta elettronica: remel@remel.com

Mandatario nella Comunità Europea:

Remel Europe Ltd.

Clipper Boulevard West, Crossways

Dartford, Kent, DA2 6PT

UK

IFU 24540IT01, revisione del 7 gennaio 2005

Stampato in USA

ProSpec[™] è un marchio registrato di Remel Inc.