



ISTRUZIONI PER L'USO

CRYPTO+GIARDIA CARD PLUSTEST IMMUNOCROMATOGRAFICO *IN VITRO* PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTIGENI DI *CRYPTOSPORIDIUM* E *GIARDIA* IN CAMPIONI DI FECE UMANE, COMPRENSIVO DEI CONTROLLI**1 – INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO**Per solo uso diagnostico *in Vitro*

Giardia e *Cryptosporidium* sono parassiti che si trovano nell'acqua. La *Giardia* causa una malattia intestinale chiamata giardiasi. Il *Cryptosporidium* è responsabile di una malattia simile chiamata criptosporidiosi. Queste infezioni sono diventate le cause più comuni di malattie trasmesse dall'acqua all'uomo, riscontrabili sia nell'acqua potabile che in quella ricreativa.

Giardia, un protozoo flagellato, abita la parte superiore dell'intestino tenue del suo ospite e presenta due stati principali nel ciclo vitale: trofozoite che produce gli antigeni (α -1 giardina) e le cisti che producono gli antigeni (CWP1). Dopo che l'ospite ha ingerito le cisti, che rappresentano lo stadio infettivo, i trofozoiti emergono dalle cisti nel duodeno e si attaccano alla mucosa dell'intestino tenue. Subiscono una divisione mitotica nel lume intracellulare, alcuni di essi si incistano per proteggersi e vengono eliminati dall'ospite con le feci. Il trofozoite è la forma vegetativa e si replica nell'intestino tenue. La giardiasi è una malattia diarroica causata da un parassita molto piccolo, *Giardia intestinalis* (noto anche come *Giardia lamblia* e *Giardia duodenalis*).

Una volta che un animale o una persona sono stati infettati dalla *Giardia*, il parassita vive nell'intestino e viene trasmesso nelle feci. Il parassita è protetto da un guscio esterno e può sopravvivere fuori dal corpo e nell'ambiente per molto tempo. I sintomi più comuni della giardiasi sono: diarrea, feci sciolte o acquose, crampi allo stomaco e mal di pancia. Questi sintomi iniziano generalmente 1-2 settimane dopo l'infezione e possono durare 2-6 settimane in soggetti sani. A volte i sintomi durano più a lungo e possono portare a perdita di peso e disidratazione. Alcune persone non presentano sintomi. Tuttavia, le persone con un sistema immunitario indebolito (ad esempio, persone affette da HIV/AIDS, pazienti oncologici e pazienti sottoposti a trapianto) o gli anziani possono avere un'infezione più grave che può portare a malattie gravi o alla morte.

Il *Cryptosporidium parvum* è la principale causa di diarrea persistente nei Paesi in via di sviluppo. Questo parassita è riconosciuto come un patogeno enterico altamente infettivo e lo stadio infettivo è trasmesso per via oro-fecale. I sintomi della criptosporidiosi comprendono diarrea acquosa, crampi allo stomaco, perdita di peso, nausea e talvolta febbre.

CRYPTO+GIARDIA CARD PLUS è un test rapido immunocromatografico, manuale, per la determinazione qualitativa simultanea di *Cryptosporidium* e *Giardia* (α 1-giardina e/o CWP1) in campioni fecali. Il test è da intendersi come test di screening altamente sensibile e semplice per avere una diagnosi presuntiva di criptosporidiosi e/o giardiasi. Il kit include un controllo positivo.

2 – PRINCIPIO DEL METODO

Crypto+Giardia Card Plus è un metodo immunocromatografico assolutamente non invasivo, semplice da eseguire, rapido e molto preciso nel risultato, per la determinazione degli antigeni di *Cryptosporidium* e *Giardia* (α 1-giardina e CWP1) in campioni fecali.

Nel device vi è una strip costituita da una membrana di nitrocellulosa pre-rivestita con anticorpi monoclonali di topo specifici per *Giardia* in corrispondenza della prima banda test e anticorpi monoclonali specifici per *Cryptosporidium* in corrispondenza della seconda banda test, con anticorpi policlonali di coniglio contro una proteina specifica, sulla linea di controllo (C). Il tampone assorbente della strip viene spruzzato con una soluzione contenente anticorpi monoclonali di topo anti-*Giardia* coniugati con lattice di polistirene blu, anticorpi anti-*Cryptosporidium* coniugati con lattice di polistirene rosso e con una soluzione contenente una proteina legante specifica coniugata con lattice di polistirene verde, formando complessi coniugati colorati. Se il campione è positivo per *Giardia*, gli antigeni del campione diluito reagiscono con il complesso di colore blu (anticorpi monoclonali anti-*Giardia* e microsferi di polistirene blu), precedentemente pre-essiccata sul tampone assorbente. Se il campione è positivo per *Cryptosporidium*, gli antigeni del campione diluito reagiscono con il complesso di colore rosso (anticorpi monoclonali anti-*Cryptosporidium* e microsferi di polistirene rosso), precedentemente pre-essiccata sul tampone assorbente. La miscela si muove quindi lungo la membrana per azione capillare. Mentre il campione scorre, trascina anche i complessi coniugati. Gli anticorpi anti-*Giardia* e/o anti-*Cryptosporidium* presenti sulla membrana (linee del test) catturano il coniugato colorato e si formeranno una o due linee colorate (blu e/o rossa). Queste bande vengono utilizzate per interpretare il risultato.

Se il campione è negativo, non c'è presenza di antigene *Giardia* e *Cryptosporidium*, ma gli antigeni possono essere presenti in una concentrazione inferiore al valore limite di rilevazione, per cui la reazione non avverrà con i complessi coniugati di colore blu e rosso. Gli anticorpi anti-*Giardia* e anti-*cryptosporidium* presenti sulla membrana (linee di test) non cattureranno il complesso coniugato antigene-blu o rosso (non formati), per cui non appariranno le linee blu e rossa. Independentemente dal fatto che il campione sia positivo o meno, la miscela continua a muoversi attraverso la membrana verso gli anticorpi specifici immobilizzati posti nella linea di controllo. Gli anticorpi anti-specifici presenti sulla membrana cattureranno il complesso verde-coniugato del controllo e apparirà sempre la banda di controllo. La presenza di questa linea verde serve a: 1) verificare che sia stato aggiunto un volume sufficiente, 2) verificare che il flusso sia corretto e 3) come un controllo interno per i reagenti.

3 – MATERIALI FORNITI – CONFEZIONAMENTO

Prodotto	Tipologia	REF	Confezione
Crypto+Giardia Card Plus CND: W0104050299; EDMA: 15.05.10.90; RDM: 1671716/R	Test immunocromatografico	VC1023P (25 test)	25 buste di alluminio sigillate contenenti la card e un essiccante. 25 flaconi di plastica con tappo gocciolatore contenenti il liquido di estrazione. Da usare anche come controllo negativo. (25 x 1 mL) 1 flacone di vetro con tappo gocciolatore contenente il controllo positivo, componenti non infettivi e NaN ₃ come conservante. (1 x 0,5 mL). 10 pipette di plastica gocciolatrici. Imballo secondario: scatola di cartone.

4 – MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Dispositivi per la raccolta dei campioni; Provette/tubi da saggio; Guanti monouso; Cronometro.

5 – PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- Tutte le operazioni riferite all'esecuzione del test devono essere condotte in accordo alle Buone Pratiche di Laboratorio.
- Crypto+Giardia Card Plus è un kit qualitativo per l'uso diagnostico *in vitro*, per il solo uso professionale; deve essere utilizzato da personale di laboratorio qualificato e adeguatamente addestrato.
- Questo prodotto è classificato non pericoloso in accordo alla Legislazione Europea vigente.
- Evitare di toccare le strisce di nitrocellulosa con le dita.





- Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi e manipolati nello stesso modo di agenti infettivi.
- Ciascuna card e ciascun flacone di liquido di estrazione devono essere usati una sola volta.
- Non usare reagenti di altri lotti o di altri kit.
- La card deve rimanere nella busta chiusa fino al suo utilizzo; e comunque eseguire il test entro 2 ore dall'apertura della busta.
- Non usare la card se la busta è danneggiata.
- La presenza di linee gialline nella finestra dei risultati visibili prima dell'esecuzione del test è del tutto normale. Questo non influenza la funzionalità del test.
- Usare i guanti per la manipolazione dei campioni fecali.
- Eliminare i guanti, i liquidi di estrazione, le provette e le card utilizzate rispettando le regole di laboratorio ed utilizzando appositi contenitori per il rischio biologico.
- Non utilizzare dopo la data di scadenza e non usare il test se la confezione è danneggiata. La qualità dei reagenti non può essere garantita oltre la data di scadenza o se il kit è conservato in condizioni non appropriate.
- Il Certificato di Analisi e la Scheda Dati di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito web: www.masciabrunelli.it.
- Se il dispositivo contiene materie prime di origine animale, la materia prima in questione proviene da animali che sono stati macellati in un macello autorizzato e che, a seguito di un'ispezione antemortem, non hanno mostrato alcun segno di malattia trasmissibile all'uomo o agli animali. In ogni caso si raccomanda di trattare il kit come potenzialmente infettivo, e di manipolarlo osservando le consuete precauzioni specifiche: non ingerire, inalare o far entrare in contatto con pelle, occhi, mucose.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.
- Comunicare a Mascia Brunelli Spa e alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo diagnostico in vitro. complaint@masciabrunelli.it

6 – CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA

Conservare nella confezione sigillata in frigorifero o a temperatura ambiente (2-30°C/36-86°F). Il kit è stabile fino alla data di scadenza stampata sulla confezione se opportunamente conservato. I dispositivi (card) devono rimanere nelle buste chiuse fino all'utilizzo. Non usare la card dopo 2 ore dall'apertura. Non congelare.

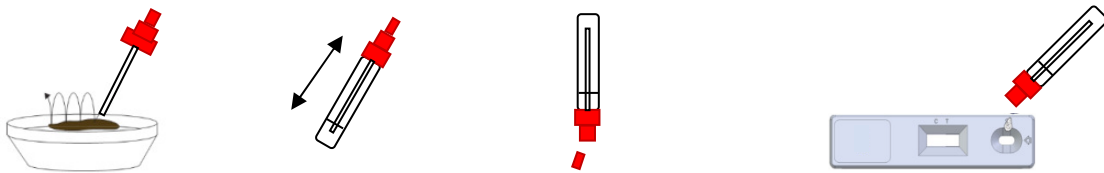
7 – RACCOLTA DEL CAMPIONE

Raccogliere le feci appena possibile dopo l'apparizione della sintomatologia specifica. Raccogliere una quantità sufficiente di feci (1-2 g o mL per campioni liquidi). I campioni devono essere raccolti in un contenitore pulito ed asciutto (nessun conservante o terreno di trasporto) e conservati a +2°C - +8°C per un massimo di **3 giorni** prima di essere testati. Per periodi di stoccaggio più lunghi, massimo **un mese**, i campioni vanno congelati a -20°C. In questo caso, il campione andrà completamente scongelato e portato a temperatura ambiente prima di poter essere processato. Omogenizzare il campione fecale e procedere appena possibile alla preparazione. Non sono raccomandati cicli di congelamento e scongelamento.

Preparazione dei campioni

Aprire la parte superiore del tubo di estrazione. Prelevare il campione con il bastoncino del tappo, toccando le feci in *quattro* punti diversi. Verificare di trasferire all'interno del tubo di estrazione una piccola quantità di feci. Riavvitare il tappo con il bastoncino e miscelare per ottenere una soluzione omogenea. Attendere almeno 3 minuti. Se necessario ripetere queste operazioni fino ad ottenere una soluzione giallo scuro-bruna.

Trasferire poche feci, miscelare poco la soluzione o lasciare le feci in sospensione nel tubo di estrazione può dare origine a risultati falsi negativi. Verificare di trasferire la quantità giusta di feci nel tubo di estrazione. Miscelare il campione su vortex prima dell'uso. L'aggiunta di una quantità superiore di feci potrebbe dare luogo a risultati non validi per la migrazione difficoltosa del campione lungo la membrana. Per **fecce liquide o semi-solidi** usare una pipetta di trasferimento, prelevando una quantità di feci dal campione stesso. Dispensare 125µL del campione fecale nel flacone di liquido di estrazione del campione. Agitare delicatamente e assicurarsi che il campione sia ben disperso.



8 – PROCEDIMENTO DEL TEST

Prima di effettuare il test lasciare che i campioni di feci e il liquido di estrazione raggiungano temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F). Non aprire le buste con le card fino a quando non si è pronti ad effettuare l'analisi.

1. Togliere la card dalla busta e usare il prima possibile. Porre la card su una superficie piana e pulita. Identificarla con i dati del paziente.
2. Miscelare la soluzione nel tubo con il liquido di estrazione e il campione. Rompere il beccuccio sul tappo.
3. Usare una card per ciascun campione. Dispensare 3 gocce nel pozzetto indicato dalla lettera S. Evitare di aggiungere parti solide insieme al liquido.
4. Leggere il risultato 10 minuti dopo aver dispensato il campione. Non superare i 10 minuti.

Se il test non funziona a causa di particelle solide, agitare il campione aggiunto nella finestra del campione (S) con il bastoncino. Se non funziona, dispensare una goccia di diluente fino a vedere il liquido scorrere nella zona di reazione.

9 – PROCEDIMENTO PER I CONTROLLI

Aggiungere il volume richiesto, 2-3 gocce (circa 100 µL) di Controllo Positivo/negativo nel pozzetto campione S e leggere il risultato dopo 10 minuti.

10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati devono essere interpretati nel seguente modo:





		Interpretazione dei risultati
1.	- ROSSO	Assenza di <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> . Risultato negativo.
	- BLU	
	+ VERDE	
2.	+ ROSSO	Presenza di <i>Cryptosporidium</i> e di <i>Giardia</i> . Infezione da <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> (α 1-giardina e/o CWP1).
	+ BLU	
	+ VERDE	
3.	+ ROSSO	Presenza di <i>Cryptosporidium</i> . Infezione da <i>Cryptosporidium</i> .
	- BLU	
	+ VERDE	
4.	- ROSSO	Presenza di <i>Giardia</i> . Infezione da <i>Giardia</i> (α 1-giardina e/o CWP1).
	+ BLU	
	+ VERDE	
5.	- ROSSO	Risultati non validi, si consiglia di ripetere il test usando lo stesso campione con un'altra card.
	- BLU	
	- VERDE	

NON VALIDO: Assenza totale di linee di controllo (VERDE) indipendentemente dalla comparsa o meno delle linee test (ROSSO o BLU). Volume insufficiente del campione, tecniche procedurali errate o deterioramento dei reagenti sono le ragioni principali della mancanza delle linee di controllo. Rivedere la procedura e ripetere il test con un nuovo dispositivo. Se i sintomi o la situazione persistono e contattare il distributore locale.

NOTA ALL'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'intensità delle linee test rossa e blu (T) nella finestra dei risultati varia in funzione della concentrazione di antigeni presenti nel campione, tuttavia, non è possibile effettuare nessuna valutazione quantitativa così come nessun tasso di aumento degli antigeni.

11 – CONTROLLO QUALITÀ INTERNO

In ogni striscia reattiva è inclusa la procedura di Controllo Qualità interno. La formazione della banda di controllo "C" conferma che la tecnica procedurale è corretta e che il volume del campione è sufficiente.

12 – VALORI ATTESI

Le malattie parassitarie causano oltre il 33% dei decessi globali, di cui le infezioni parassitarie intestinali sono ritenute la quota maggiore. La mancanza di acqua potabile sicura e la mancanza di igienizzazione degli ambienti è in gran parte responsabile di oltre 800 milioni di casi di malattie diarroiche e di 4,5 milioni di decessi associati in molti Paesi in via di sviluppo ogni anno (3).

La morbilità e la mortalità dovute alle malattie diarroiche nei Paesi in via di sviluppo rimangono i principali problemi di salute pubblica che richiedono la dovuta attenzione. Sebbene ci possano essere molte altre cause di diarrea, i protozoi enterici *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* sono stati riconosciuti come cause importanti di diarrea sia correlata all'epidemia che sporadica tra gli esseri umani. Sia gli individui immunocompetenti che immunocompromessi possono essere vittime di malattie diarroiche causate da questi parassiti.

13 – CARATTERISTICHE

Sensibilità e Specificità

Alcuni campioni fecali sono stati studiati secondo Criteri di valutazione. Criteri di valutazione: sono stati provati due test rapidi (MB Crypto+Giardia e MB Crypto dipstick/MB Giardia Card) un altro test rapido di un concorrente; i risultati discrepanti vengono confermati da tecnica PCR. I risultati sono i seguenti:

	Criteri di valutazione (Crypto)			
	+	-	Totale	
Crypto+Giardia CARD PLUS	+	33	0	33
	-	2	91	93
	Totale	35	91	126

	Valore medio	Intervallo di confidenza 95%
Sensibilità	94.3%	80.8 – 99.3%
Specificità	100.0%	96.0 – 100.0%
PPV	100.0%	89.4 – 100.0%
NPV	97.8%	92.4 – 99.7%

	Criteri di valutazione (Giardia)			
	+	-	Totale	
Crypto+Giardia CARD PLUS	+	44	2	46
	-	1	79	80
	Totale	45	81	126

	Valore medio	Intervallo di confidenza 95%
Sensibilità	97.8%	88.2 – 99.9%
Specificità	97.5%	91.4 – 99.7%
PPV	95.7%	85.2 – 99.5%
NPV	98.8%	93.2 – 100.0%

Cross-Reattività

E' stata valutata la cross-reattività di Crypto+Giardia Card Plus; non c'è cross-reazione con i comuni patogeni intestinali, altri organismi e/o sostanze e marker fecali occasionalmente presenti nelle feci: *Adenovirus*, *Astrovirus*, *calprotectina*; *emoglobina bovina*, *umana e suina*; *lattoferrina umana*; *transferrina umana*, *Tossine A e B di C. difficile*, *C. difficile GDH*, *Clostridium perfringens*, *Entamoeba histolytica*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli* e *jejuni*, *E.ColiO157:H7*, *E.ColiO111*; *E.ColiO26*; *Legionella pneumophila*; *Listeria monocytogenes*, *Norovirus GI e GII*; *Rotavirus*; *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Streptococco pneumoniae*; *Streptococco pyogenes*; *Yersinia enterocolitica O:3 e O:9*.

14 – LIMITI DEL METODO

- Un eccesso di campione fecale potrebbe dare un risultato errato (comparsa di banda marrone o assenza di banda di controllo). Diluire il campione con il tampone e ripetere il test.
- Crypto+Giardia Card Plus deve essere utilizzato solo su campioni fecali umani. L'uso di altri tipi di campioni non è stato valutato. La qualità del test dipende dalla qualità del campione; è necessario ottenere campioni fecali adeguati.
- Usare solo campioni freschi o campioni freschi congelati. Non usare campioni trattati con soluzioni contenenti formaldeide o suoi derivati.
- Un risultato positivo determina la presenza di parassiti nel campione (determinazione qualitativa) e deve essere usato esclusivamente per la determinazione degli antigeni di *Cryptosporidium* e *Giardia* (α -1 giardina e/o CWP1) nelle feci. Né un dato quantitativo, né il tasso di incremento dell'antigene può essere determinato con questo test.





- Dopo una settimana dall'infezione, il numero di parassiti nelle feci inizia a decrescere rendendo il campione meno reattivo. Il campione di feci dovrebbe essere raccolto nella prima settimana dall'insorgenza dei sintomi.
- Un risultato positivo deve essere seguito da ulteriori tecniche di laboratorio (metodi biochimici o microscopia) per confermare i risultati. La conferma dell'infezione deve comunque essere fatta dal medico solo dopo aver valutato tutti i risultati clinici e di laboratorio e deve basarsi sulla correlazione dei risultati con ulteriori osservazioni cliniche.
- Un risultato negativo non preclude la presenza di parassiti perché potrebbero essere presenti ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità. Se i sintomi clinici persistono, si raccomanda di eseguire ulteriori test con altri metodi clinici (per esempio microscopia).
- Campioni mucosi e/o ematici possono causare reazioni non specifiche. Se il risultato con questi campioni è positivo, si consiglia di confermarlo con altre tecniche.

14 – BIBLIOGRAFIA

1. MARSHALL, M.M., et al., "Waterborne Protozoan Pathogens", Clinical Microbiology Review, Jan. 1997, pp 67-85.
2. DYLAN R. PILLAI and KEVIN C, KAIN, "Immunochromatographic Strip-Based Detection of Entamoeba histolytica-E. dispar and Giardia lamblia Coproantigen". Journal of Clinical Microbiology, Sept. 1999, Vol. 37, No 9, p. 3017-3019.
3. LYNNE S. GARCIA et al., "Commercial Assay for Detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum Antigens in Human Fecal Specimens by Rapid Solid-Phase Qualitative Immunochromatography", Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2003, Vol. 41, No. 1, p. 209- 212.
4. ADAM RODNEY. Biology of Giardia lamblia. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):447-475. doi:10.1128/CMR.14.3.447-475.2001).
5. GAÉTAN FAUBERT. Immune Response to Giardia duodenalis. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(1): 35-54. 0893-8512/00/\$04.00+.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti di temperatura		Codice del lotto (DXXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto		Identificatore dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)		Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'uso (IFU) - Revisione 1	Aggiornamento del contenuto e del layout	2022/12

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

