



INSTRUÇÕES DE USO

Somente para Uso diagnóstico in vitro

CRYPTOSPORIDIUM II

96 Testes

Revisão: Maio/08

Finalidade ou Uso

Cryptosporidium II é um teste imunoenzimático para detecção qualitativa do antígeno oocisto de *Cryptosporidium parvum* em amostras fecais.

É indicado para utilização em amostras fecais de pacientes com diarreia para determinar a presença de infecção gastrointestinal por *Cryptosporidium*. Este teste pode ser utilizado em amostras fecais submetidas a testes clínicos de rotina em adultos ou crianças.

Introdução

Cryptosporidium SSP. é um protozoário parasita dos vertebrados, considerado inicialmente como causador de diarreias somente em animais (1). Em 1976, foi reportada a primeira infecção em seres humanos (2). Desde então ele tem sido associado a diarreias em muitas partes do mundo sendo a causa frequente da diarreia em viajantes (1,3).

A doença é transmitida pela forma oocística, com 2-6 µm de diâmetro, que é resistente aos desinfetantes comuns e à cloração rotineira da água potável. É comum a transmissão inter pessoal especialmente entre crianças (4). *Cryptosporidium* possui baixa ou nenhuma especificidade ao hospedeiro e animais como os roedores, gados e animais de estimação domésticos servem como reservatórios de transmissão zoonótica para os seres humanos (1,5). Isto ocorre tanto por contaminação direta como através da água contaminada com material fecal (1,6,7,8). Criptosporidiose é uma infecção oportunista perigosa em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e é considerada uma doença sexualmente transmitida (6,9). As manifestações clínicas da criptosporidiose inclui diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos e perda de peso. Em pessoas normais a infecção é geralmente auto-curável e de curta duração. Em pacientes com SIDA e imunodeprimidos, a criptosporidiose pode resultar em uma doença prolongada com risco de vida devido a excessiva perda de líquidos. Nesses pacientes a infecção pode também difundir-se para os tratos respiratório e biliar (6).

Princípio

Cryptosporidium II utiliza anticorpos monoclonais e policlonais contra o antígeno de superfície do organismo. As cavidades da microplaca presente no kit contêm anticorpos monoclonais imobilizados e o *Anticorpo Detector* consiste de um anticorpo policlonal, ambos específicos para o antígeno celular de superfície. No teste, uma alíquota da amostra fecal é transferida para a cavidade da microplaca. Se houver presença de antígeno de *Cryptosporidium*, ele irá se ligar ao anticorpo monoclonal imobilizado. Quando o *Anticorpo Detector* é adicionado, ele irá se ligar ao complexo antígeno-anticorpo. O *Anticorpo Detector* ligado é detectado utilizando-se um conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase. Todo material não ligado é removido durante as etapas de lavagem. Seguindo-se a adição do substrato, uma cor é detectada devido ao complexo enzima-anticorpo-antígeno que se forma em presença do antígeno de *Cryptosporidium* e conjugado.

Material fornecido

- **Substrato** – 14,0 ml (solução contendo substrato tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio)
- **Conjugado** – 7,0 ml (anti-IgG de coelho-peroxidase em solução contendo 0,02% de timerosal)
- **Diluyente** – 50 ml (solução tampão contendo 0,02% de timerosal) O diluyente também pode ser utilizado como controle negativo. Veja procedimento do teste.



- **Solução de Bloqueio** – 7,0 ml (ácido sulfúrico 0,6 M). Cuidado: evitar contato com a pele. Se houver contato, lavar imediatamente com água.
- **Controle positivo** – 3,5 ml (material fecal bovino inativado pelo calor contendo antígeno de *Cryptosporidium* em solução contendo 0,02% de timerosal)
- **Tampão de Lavagem concentrado** – 50 ml, 20 x concentrado (tampão salina fosfato com 0,2% de timerosal)
- **Microplaca** – 12 tiras, contendo 8 cavidades cada sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-antígeno de superfície do *Cryptosporidium*) Armazenada com dessecante.
- 100 pipetas descartáveis graduadas
- 2 folhas adesivas plásticas
- 1 embalagem reselável

Material necessário, não fornecido

Frasco para Reagente de Lavagem

Agitador tipo vortex

Cronômetro

950 ml de água destilada para diluição do Reagente de Lavagem

1 frasco de 1 litro para Reagente de Lavagem diluído

Leitor de microplaca de ELISA para leitura a 450 nm

Recipiente de descarte e papel absorvente

Tubos teste

Pipetas

Precauções

1. Não misturar reagentes de lotes diferentes. Não utilizar o kit após a data de validade.
2. Os reagentes devem estar a temperatura ambiente antes do uso.
3. Tampas e rolhas possuem um código de cor, não misturar.
4. Quando estiver manipulando as cavidades teste, cuidado para não arranhar a parte inferior da cavidade, pois pode resultar em leituras de absorbâncias elevadas.
5. Segurar o frasco conta-gotas verticalmente para assegurar uma gota ideal.
6. Após o uso as cavidades da microplaca devem se manipuladas e descartadas como material potencialmente infectante
7. Os reagentes contêm 0,02% de timerosal como conservante e devem ser manipulados com os cuidados normais de laboratório.
8. A *Solução de Bloqueio* contém ácido sulfúrico 0,6 M. Se ocorrer contato com a pele lavar com água imediatamente
9. O substrato é sensível a luz e deve ser mantido protegido, contra irradiação solar direta, caso o substrato seja exposto ao contato direto da luz solar e mudar de cor deverá ser descartado.
10. As cavidades teste não utilizadas devem permanecer na embalagem reselável contendo o dessecante para protegê-las contra umidade.
11. O procedimento de lavagem deve ser realizado como explicado anteriormente, evitando reações com alto ruído de fundo.
12. *Cryptosporidium II* é somente para uso diagnóstico in vitro.

Armazenamento

A data de validade do kit vem especificada na rotulagem externa. As datas de expiração de cada componente estão indicadas em cada etiqueta individual (rotulagem interna). O kit deve ser armazenado entre 2-8°C e deve retornar a geladeira assim que possível após o uso.

Manuseio das amostras

1. Os procedimentos de coleta e manipulação utilizados pelo laboratório para amostras de fezes para cultura são apropriados. Não é necessária nenhuma modificação no método de coleta utilizado para microscopia de fezes. As amostras devem ser utilizadas sem conservantes ou congelamento, ou com meio conservante a 10% de formalina.
2. Amostras sem conservante devem ser armazenadas a 2-8°C e testadas dentro de 24 horas da coleta. As amostras que não puderem ser testadas nesse prazo devem ser armazenadas a -20°C ou menos até o momento do teste.

3. Amostras com conservante podem ficar a temperatura ambiente e testadas dentro de 18 meses após a coleta.
4. Não são requeridas etapas de concentração para as amostras de fezes.
5. Certificar-se que as amostras estejam homogeneizadas (vortex) antes da realização do teste.
6. Todas as diluições devem ser feitas com a *Diluyente*.

Preparação dos reagentes

1. Os componentes do kit devem estar a temperatura ambiente antes do uso.
2. Preparar a *Solução de Lavagem* a 1X. O *Tampão de Lavagem* concentrado é fornecido 20x concentrado (um precipitado pode ser observado). Ele deve ser diluído para 1 litro adicionando-se 50 ml do concentrado a 950 ml de água destilada. Etiquetar o frasco. Armazenar a *Solução de Lavagem* a 1X entre 2-8°C.
3. Todos os reagentes com exceto o tampão de lavagem concentrado, são fornecidos em frascos prontos para uso. Os reagentes podem ser dispensados direto do frasco conta gotas ou através de pipetas. Se houver decantação do excesso de reagente, este deve ser descartado. Não por o excesso de volta no frasco. O substrato deve ser armazenado longe de contato com a luz. Se uma quantidade do substrato for retirada do frasco original, e por algum motivo não for utilizada, não retorne este substrato utilizado para o frasco original.

Preparação das amostras

1. Amostras frescas/congeladas
Amostras congeladas devem ser descongeladas. Adicionar 0,1 ml da amostra a 0,4 ml de *Solução de Lavagem* para ter uma diluição a 1:5. Se a amostra não puder ser pipetada, utilizar um aplicador para transferir aproximadamente 0,1 grama de fezes. Isso corresponde ao tamanho de uma pequena ervilha (cerca de 4 mm de diâmetro)
2. Amostras conservadas.
Misturar o conteúdo do recipiente antes de transferir a amostra. Não é necessário nenhum processo de diluição.

Procedimento

1. Duas cavidades controle devem se utilizadas toda vez que um teste for realizado. Essas cavidades servirão como controle positivo e negativo. Segurar os frascos na vertical quando for gotejar. Para o controle positivo, agite o frasco de *Cryptosporidium II* Controle Positivo por alguns segundos, em seguida adicione uma gota (50 µl) na cavidade do controle positivo, e adicione 2 gotas (100 µl) do diluente na cavidade do controle negativo.
2. Adicionar (100 µl) do Diluente a cada cavidade teste da microplaca. Transferir 1 gota (50 µl) da amostra a cada cavidade teste contendo o Diluente e agitar gentilmente a placa. Selar com adesivo plástico e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
3. Descartar o conteúdo das cavidades em um recipiente próprio. Lavar as cavidades utilizando um pissete contendo a *Solução de Lavagem*, direcionado o jato para o fundo da cavidade, com força. Preencher as cavidades, e descartar a *Solução de Lavagem* em um recipiente próprio. Inverter a microplaca sobre uma toalha de papel seca; repetir a etapa de lavagem 4x utilizando uma folha de papel seca a cada vez.
4. Após lavagem remover completamente qualquer resíduo líquido presente nas cavidades batendo a placa sobre o papel toalha até todo o líquido ser eliminado. Descartar o papel toalha e as amostras em recipiente próprio.
5. Adicionar uma gota (50 µl) do *Conjugado* a cada cavidade e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente
6. Repetir a etapa de lavagem (etapas 3 e 4)
7. Adicionar duas gotas (100 µl) do *Substrato* a cada cavidade. Gentilmente bater na lateral da placa para misturar. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Adicionar uma gota (50 µl) de *Solução de Bloqueio* a cada cavidade. Agite gentilmente e aguarde 2 minutos antes de proceder com a leitura. A adição da *Solução de Bloqueio* converte a cor azul à cor amarela que pode ser quantificada pela medição da absorbância a 450 nm em um leitor de microplacas ELISA (referência 620 ou 450 nm em leitor de comprimento de onda duplo). O instrumento deve ser zerado contra o ar. Limpar a parte inferior da cavidade antes da leitura da densidade óptica.



Se não houver disponibilidade de um leitor ELISA, o teste pode ser lido visualmente sob uma boa luz contra um fundo branco. Realizar a leitura dentro de 10 minutos após a adição da *Solução de Bloqueio*.

Controle de Qualidade

1. Um controle positivo e um negativo deve ser realizado a cada série de testes. O controle positivo demonstra se o ensaio está funcionando apropriadamente para a detecção de oocisto de *Cryptosporidium* em amostras fecais. O Controle Negativo demonstra se o teste não está reagindo inespecificamente.
2. Os controles negativo e positivo devem fornecer resultados dentro de seus limites ou o teste não é válido.
 - a) O Controle Positivo deve apresentar cor amarela. Se a leitura for realizada em espectrofotômetro de 450 nm e/ou 450/620 nm a DO deve ser ≥ 0.500 .
 - b) O Controle Negativo não deve apresentar cor. Se a leitura for realizada em espectrofotômetro a DO a 450 nm deve ser $< 0,150$ ou a DO a 450/620 deve ser < 0.090 .
 - c) Qualquer cavidade que apresente leitura positiva sem coloração visível deve ser reposicionada, limpar a parte inferior da cavidade e ler novamente.
3. A cavidade controle negativo deve ser incolor ou apresentar cor amarela fraca, porém o valor da absorbância deve ser $< 0,150$.
4. Os resultados não serão validados se as características de desempenho dos controles negativo e positivo não estiverem corretas. Se os resultados não forem os esperados entrar em contato com o Atendimento ao Consumidor.
5. Cada componente do kit deve ser inspecionado para verificar qualquer sinal de vazamento. Após o recebimento, o kit deve ser inspecionado para se certificar que os componentes não estejam congelados ou aquecidos.
6. Os resultados, de acordo com os valores de absorbâncias dos controles, devem ser registrados e reportados de acordo com os procedimentos próprios de cada laboratório e devem ser armazenados de acordo com os procedimentos próprios para futuras referências.

Interpretação dos resultados

1. Interpretação Visual

Negativo: qualquer amostra que não apresente cor amarela maior que o controle negativo.

Positivo: qualquer amostra que apresente cor amarela maior que o controle negativo.

Nota: O controle negativo, assim como as amostras, pode apresentar uma cor amarela fraca. A cavidade da amostra que for mais forte que o controle negativo deve ser reportado como positiva.

2. Espectofotometria em comprimento de onda simples a 450 nm

Negativo = DO 450 $< 0,150$

Positivo = DO 450 $\geq 0,150$

3. Espectofotometria em comprimento de onda duplo a 450/620 nm

Negativo = DO 450/620 $< 0,090$

Positivo = DO 450/620 $\geq 0,090$

Um resultado positivo indica a presença de oocisto de *Cryptosporidium* na amostra de fezes. Um resultado negativo indica que não há presença de oocisto de *Cryptosporidium* na amostra de fezes.

Limitações do procedimento

1. *Cryptosporidium* II detecta a presença de antígenos de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes.
2. Os resultados devem ser interpretados por um técnico considerando-se outros resultados laboratoriais e história clínica.
3. Amostras de fezes concentradas não devem ser testadas no *Cryptosporidium* II, pois não fornecerão resultados confiáveis.

Valores esperados

Indivíduos saudáveis não devem estar infectados com e devem apresentar resultado negativo no *Cryptosporidium* II. Um resultado positivo no *Cryptosporidium* II indica que o indivíduo possui quantidades detectáveis de oocistos de *Cryptosporidium*. A incidência da infecção por *Cryptosporidium* varia significativamente entre populações e regiões geográficas.

Em geral, a incidência confirmada em laboratórios em países desenvolvidos varia entre 1 a 2% com incidência maior em crianças (10)

Características de desempenho

Sensibilidade / Especificidade

A) Em um estudo *Cryptosporidium* II foi avaliado utilizando-se amostras de fezes conservadas com formalina a 10%. As amostras foram identificadas por microscopia como sendo *Cryptosporidium*-positivas utilizando-se o método convencional de concentração em formalina-etil acetato. Para a avaliação, *Cryptosporidium* II foi comparado com os resultados obtidos no método convencional. Resultados discrepantes foram resolvidos pela imunofluorescência.

Das 185 amostras analisadas, 44 foram determinadas positivas para *Cryptosporidium* pela microscopia e pelo *Cryptosporidium* II.

Um total de 141 amostras foram negativas por ambos os testes.

A análise estatística comparando a microscopia com *Cryptosporidium* II está apresentada abaixo.

Quando comparada com a microscopia, *Cryptosporidium* II apresentou uma sensibilidade e especificidade relativas de 97,7 e 100%, respectivamente.

<i>Cryptosporidium</i> II versus microscopia (n = 260)	Microscopia positiva	Microscopia negativa
<i>Cryptosporidium</i> II – positivo	43	0
<i>Cryptosporidium</i> II - negativo	1	141

Sensibilidade	97.7 % (86,5% - 99,9%)
Especificidade	100 % (96,7% - 100%)
Valor preditivo positivo	100 % (89,8% - 100%)
Valor preditivo negativo	99.3 % (95,6% - 99,9%)
Correlação	99.5 % (99,3% - 99,6%)

95% CI

Reatividade cruzada

Cryptosporidium II foi avaliado utilizando-se amostras positivas para uma variedade de patógenos intestinais. Não se observou nenhuma reatividade cruzada com amostras de fezes contendo os parasitas listados na Tabela abaixo. O número de amostras testadas com cada organismo é mostrado entre parêntesis.

<i>Ascaris lumbricoides</i> (5)	<i>Hookworm</i> (1)
<i>Blastocystis hominis</i> (35)	<i>Iodamoeba butchlii</i> (4)
<i>Clonorchis</i> (1)	<i>Isospora belli</i> (2)
<i>Dientamoeba fragilis</i> (23)	<i>Microsporidium</i> (1)
<i>Diphyllobothrium latum</i> (1)	<i>Trichuris trichiura</i> (2)
<i>Endolimax nana</i> (37)	<i>Strongyloides stercoralis</i> (3)
<i>Entamoeba coli</i> (22)	<i>Taenia</i> (1)
<i>Entamoeba hartmanii</i> (3)	<i>Chilomastix mesnili</i> (1)
<i>Giardia</i> (40)	<i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i> (7)
<i>Cyclospora cayetanensis</i> (2)	<i>Hymenolepis nana</i> (4)
<i>Enterobius vermiculares</i> (4)	



Interferência de Substâncias

As seguintes substâncias apresentaram nenhum efeito significativo nos resultados positivos e negativos, estas foram analisadas nas concentrações indicadas abaixo:

Mucina (3.5%), Sangue humano (40%), Imodiun® (5%), Kaopectate® (5mg/l), Pepto-Bismol® (5%), Metronidazola (0.25%), Vancomicina (0.25%).

Compatibilidade na Preservação das Amostras

O *Cryptosporidium* II foi examinado para compatibilidade da preservação de amostras fecais durante uma avaliação in-house, Nenhum efeito na especificidade e sensibilidade foi observado com amostras preservadas com formalina a 10% e acetato de sódio.

Reprodutibilidade intra-ensaio

O Coeficiente de Variação CV foi determinado pela análise de 4 amostras positivas e 4 negativas. Cada amostra foi analisada em quadruplicata durante 3 dias.

Amostra	CV %
Positiva	4.91
Negativa	2,71

Reprodutibilidade inter-ensaio

Foram utilizadas 4 amostras positivas e 4 negativas que foram testadas em um total de 5 séries durante 4 dias.

Amostra	CV %
Positiva	18.14
Negativa	2.51

Referências Bibliográficas

1. Fayer R and Ungar LP. 1986. Micro. Ver., 50: 458-483
2. Meisel JL et al. 1976. Gastroenterology, 1156-60
3. Sterling CR. 1986. J. Infect. Dis., 153: 380-1
4. Alpert G, et al. 1984. New England J. Med., 311: 860-1
5. Pitlik SD et al. 1983. Arch. Intern. Med., 143: 2269-74
6. Hayes EB et al. 1989. New England J. Med., 320: 1372-76
7. Angus KW. 1990. Clinical Gastroentrol., 4: 425-41

Data de vencimento, No. de Lote, No. de Registro do
Ministério da Saúde e Responsável Técnico: VIDE EMBALAGEM
Produzido por: TechLab Inc . - Corporate Research Park 1861 Pratt Drive, Blacksburg,
Virginia, USA
Importado e distribuído por: Medivax Indústria e Comércio Ltda
Av Venezuela 3, sala 303 Rio de Janeiro/RJ - CNPJ: 68.814.961-0001-73

Atendimento ao consumidor Tel: (0xx21) 2283-2833

Representante Legal
Ricardo Weizman

Responsável Técnico
Luciana Poli Fernandes
CRBio- 2 no 21.140/02