ProSpecT Cryptosporidium Mikrotiterplatten-Assay

REF R2454024 .....24 Tests **DE**
REF R2454096 .....96 Tests

1 ANWENDUNGSBEREICH

Der ProSpecT™ Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay verwendet monoklonale Antikörper zum qualitativen Nachweis von *cryptosporidium*-spezifischem Antigen (CSA) in wässrigen Extrakten von Stuhlproben.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Die Cryptosporidiosis wurde unlängst als eine humane Erkrankung eingestuft, die in den meisten Regionen der Welt von großer Bedeutung ist[6,9]. Der Erreger dieser Erkrankung, *Cryptosporidium* spp., wurde in vielen Ländern und in den meisten Bundesstaaten der USA in Stuhlproben von Kindern und Erwachsenen identifiziert[6]. Dieser Parasit wird für viele schwere Erkrankungen in den USA bei HIV-infizierten Personen[10], in Tagesstätten[1,2,11,12] und bei Ausbrüchen, die durch das Trinkwasser übertragen werden[5,7,8] verantwortlich gemacht. Zu den besonders gefährdeten Personengruppen zählen immungeschwächte Menschen, insbesondere Menschen mit einer HIV-Infektion, Familienmitglieder und Sexualpartner von infizierten Patienten, Kinder und Betreuer in Kindertagesstätten, Tierpfleger und Reisende[6]. Zu den akuten Symptomen der Cryptosporidiosis gehören Diarrhöe, Abdominalschmerz, Nausea, Vomitus, Fieber, Indisposition und respiratorische Probleme, die über mehrere Tage bis hin zu einem Monat anhalten können und bei immuninkompetenten Patienten häufig zu persistierenden Infektionen oder zum Tod führen[6]. Infektionen mit *Cryptosporidium* können zudem asymptomatisch verlaufen.

Cryptosporidium-spezifische Antigene, die im Zusammenhang mit *cryptosporidium*-Infektionen gefunden wurden, werden als Basis für Fluoreszenz- und Antigen-Immunoassays verwendet[3,4,13]. Das *Cryptosporidium*-spezifische Antigen (CSA), welches durch dieses Kit erkannt wird, wird von *Cryptosporidium*-Organismen bei deren Vermehrung im Darmtrakt des Wirts produziert. Das Antigen ist spezifisch für *Cryptosporidium* und hat bisher keine Kreuzreaktionen mit anderen Darmparasiten gezeigt. Das Antigen ist während der Verweilzeit im Darmtrakt stabil, ebenso gegenüber Routineverfahren zur Sammlung und zum Transport von Proben für die mikroskopische Untersuchung.

3 TESTPRINZIP

Beim ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay handelt es sich um einen Immunoassay fester Phase für den Nachweis von CSA. Die verdünnten Stuhlproben werden in die abbrechbaren Mikrotiterplatten-Vertiefungen gegeben, an die Anti-CSA-Antikörper gebunden sind. Wenn CSA vorhanden ist, wird es vom gebundenen Antikörper „eingefangen". Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um das ungebundene Material zu entfernen. Das Enzymkonjugat (monoklonale Anti-CSA-Antikörper, die mit Meerrettich-Peroxidase-Enzym markiert sind) wird zugefügt. Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um ungebundenes Enzymkonjugat zu entfernen. Bei einer positiven Reaktion bindet das CSA das Enzymkonjugat an die Vertiefung. Das Substrat für das Enzym, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), wird zugefügt. 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.

4 SYMBOLDEFINITIONEN

REF	Katalognummer
IVD	*In-vitro*-Diagnostikum
Σ N	Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Gebrauchsanweisung beachten
2°C 25°C	Temperaturbeschränkung (Lagertemp.)
LOT	Chargennummer (Losnummer)
	Verwendbar bis (Verfallsdatum)
	Hersteller
DILUTED SAMPLE	Verdünnte Probe

5 INHALT DES KITS, VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Der ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay enthält genügend Reagenzien für die Durchführung von Σ 24 bzw. Σ 96 Tests.

Siehe auch **Vorsichtsmaßnahmen** in Abschnitt **6**.

Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Verpackungsetikett vermerkt.

Alle Komponenten bei 2 - 8 °C lagern.

Vor dem Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und vorsichtig mischen. Unverbrauchte Reagenzien im Kühlschrank aufbewahren.

Mit Ausnahme des Waschpuffers werden die Reagenzien in der erforderlichen Konzentration geliefert. Die Reagenzien können direkt von den Tropfflaschen getropft oder zwecks Verwendung mit einer Mehrkanalpipette pipettiert werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagenz muss entsorgt werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagenz nicht wieder in die Flasche füllen.

Gebrauchsanweisung
Vollpipetten
Teststreifenhalterung und Abdeckung
Kurzanleitung

MICROTITRATION PLATE **Mikrotiterplatte***(8 Vertiefungen/ Streifen)

3 Streifen (R2454024) oder 12 Streifen (R2454096) beschichtet mit Anti-CSA-Antikörpern vom Kaninchen. Unverbrauchte Teststreifen im Beutel mit Trockenmittel lagern, um sie vor Feuchtigkeit zu schützen.

CONJUGATE **Enzymkonjugat***

Eine Tropfflasche mit 5 ml (R2454024) bzw. 25 ml (R2454096) meerrettich-peroxidase-markiertem, monoklonalem Anti-CSA (Maus) mit Rinderserum und antimikrobiellen Mitteln.

CONTROL + **Positivkontrolle**

Eine Tropfflasche mit 4 ml extrahierten *Cryptosporidium*-Oozysten in einer gepufferten Lösung mit antimikrobiellen Mitteln.

CONTROL – **Negativkontrolle**

Eine Tropfflasche mit 4 ml gepufferter Lösung mit rotem Farbstoff und antimikrobiellen Mitteln.

SAMPLE DILUENT **Probenverdünnungspuffer**

Eine Flasche mit 35 ml (R2454024) bzw. 120 ml (R2454096) einer Pufferlösung mit Kaninchenserum, rotem Farbstoff und antimikrobiellen Mitteln.

WASH BUFFER (x10) **Waschpuffer**

Eine Flasche mit 50 ml (R2454024) bzw. 120 ml (R2454096) einer (10fach) konzentrierten Pufferlösung mit antimikrobiellen Mitteln.

Das 10fach-Waschpufferkonzentrat durch die Zugabe von 1 Teil Konzentrat auf 9 Teile destilliertes oder deionisiertes Wasser auf einfache Stärke verdünnen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2 - 8 °C einen Monat lang stabil.

SUBSTRATE TMB **Farbsubstrat**

Eine Tropfflasche mit 12 ml (R2454024) bzw. 25 ml (R2454096) 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin (TMB) in Pufferlösung.

Das Farbsubstrat sollte in der lichtgeschützten Flasche, in der es geliefert wird, aufbewahrt und daraus ausgegeben werden. Wenn aus einem beliebigen Grund ein Aliquot aus der Flasche entnommen wird, das unbenutzte Farbsubstrat nicht wieder in die ursprüngliche Flasche füllen.

STOP SOLUTION **Stopplösung**

Eine Tropfflasche mit 12 ml Schwefelsäure (0,46 mol/l).

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

6 VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD

Die Reagenzien sind nur für den *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch bestimmt.

Nur für die professionelle Verwendung.

Informationen zu potenziell gefährlichen Komponenten dem Sicherheitsdatenblatt oder der Produktkennzeichnung entnehmen.

GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSINFORMATIONEN

6.1 Die Reagenzien werden aus Biomaterial hergestellt und müssen als potenziell infektiös gehandhabt werden. Die Entsorgung muss unter Einhaltung entsprechender Verfahren für infektiöses Material („Biohazard") durchgeführt werden.

6.2 Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Bei der Handhabung von Proben und der Durchführung des Tests Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen. Danach die Hände gründlich waschen.

6.3 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", 5. Ausgabe, gehandhabt werden.

6.4 Der Waschpuffer enthält Hautreizstoffe (< 1 % v/v). Hautkontakt vermeiden. Einweg-Schutzhandschuhe aus Vinyl oder Nitril tragen.

6.5 Den benutzten Waschpuffer in entsprechenden Behältern für infektiöses Material („Biohazard") entsorgen.

ANALYTISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

6.6 Alle in dieser Gebrauchsanweisung enthaltenen Anweisungen sorgfältig durchlesen und befolgen.

6.7 Mit Ausnahme des Waschpufferkonzentrats werden alle Reagenzien in Arbeitskonzentration geliefert. Reagenzien nur verdünnen, wenn ausdrücklich angewiesen.

6.8 Nicht nach dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum verwenden. Die Verwendung von Reagenzien nach dem Verfallsdatum kann die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen.

6.9 Die folgenden allgemeinen Reagenzien können in der ProSpecT-Serie produktübergreifend verwendet werden: Waschpuffer, Farbsubstrat und Stopplösung.

6.10 Durch eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien kann die Testgenauigkeit vermindert werden. Beim Entnehmen von aliquoten Teilen aus den Reagenzflaschen sterile Einwegpipetten verwenden, um eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien zu vermeiden.

6.11 Vor der Verwendung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

6.12 Teststreifen im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel lagern, um die Vertiefungen vor Feuchtigkeit zu schützen.

6.13 Die Stuhlproben müssen vor der Verarbeitung der Probe gründlich gemischt werden, um eine genaue Darstellung der Probe sicherzustellen. DIE PROBEN VOR DEM TEST NICHT KONZENTRIEREN.

6.14 Das Farbsubstrat ist lichtempfindlich. Wenn das Reagenz Licht ausgesetzt wird und Farbe entwickelt, muss es entsorgt werden.

6.15 Bediener, die an Farbenblindheit oder anderen Sehschwächen leiden, können das Testergebnis nicht visuell ablesen und müssen die Messergebnisse mithilfe des Spektrophotometers auswerten.

6.16 Reagenzien während des gesamten Verfahrens in der gleichen Reihenfolge in die Vertiefungen pipettieren. Die Flüssigkeit in den Vertiefungen nicht mit den Tropföffnungen berühren, um Kontaminierung zu vermeiden.

6.17 Die Inkubationszeit genau einhalten. Nach dem Hinzufügen des Reagens in die letzte Vertiefung auf jeder zu testenden Mikrotiterplatte die Zeitmessung starten. Nie mehr als drei Platten mit jeweils 96 Vertiefungen gleichzeitig bearbeiten, um die genaue Zeitmessung sicherzustellen. Abweichungen von diesem Testverfahren können die Testergebnisse beeinträchtigen.

6.18 Es ist wichtig, dass die Tropfflasche senkrecht gehalten wird und der Tropfen sich an der Spitze bildet. Falls die Spitze nass wird, bildet sich ein Tropfen mit dem falschen Volumen um das Ende herum und nicht an der Spitze. In diesem Fall die Spitze vor dem Fortfahren trocknen.

7 GEWINNUNG VON STUHLPROBEN

Für den ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay können Proben verwendet werden, die für mikroskopische Routine-untersuchungen entnommen werden. Die Proben sind in sauberen, leckgeprüften Kunststoffbehältern zu sammeln.

FRISCH Unbehandelte Stuhlproben können bis zum Test bei 2 - 8 °C maximal 48 Stunden aufbewahrt werden.

GEFROREN Wenn die frischen Stuhlproben nicht innerhalb von 48 Stunden getestet werden können, diese bei -20 bis -70 °C einfrieren.

KONSERVIERT Mit zehnprozentigem Formalin, MF- oder SAF-Fixiermitteln behandelte Stuhlproben können gekühlt (2 - 8 °C) oder bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) gelagert werden und müssen innerhalb von 2 Monaten nach der Gewinnung getestet werden.

CARY BLAIR In Cary Blair-Transportmedium (oder einem vergleichbaren Medium) gesammelte Proben müssen gekühlt oder eingefroren aufbewahrt und innerhalb von einer Woche getestet werden. Stuhlproben, die konzentriert oder mit PVA-Fixiermitteln behandelt wurden, sind für die Verwendung nicht geeignet.

ABSTRICH/WINDEL Stuhlproben von Rektalabstrichen oder Windeln können für den ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay verwendet werden. Die Verwendung von extrem absorbierenden Windeln ist jedoch nicht möglich.

8 TESTVERFAHREN

IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Siehe **Inhalt** in Abschnitt **5**.

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENES MATERIAL

Behälter für die Entnahme von Stuhlproben
Stoppuhr zum Messen von Minuten
Waschflasche für Waschpuffer
Destilliertes oder deionisiertes Wasser

OPTIONALE MATERIALIEN (NICHT MITGELIEFERT)

Lesegerät für Mikrotiterplatten, das 450 nm oder 450/620 bis 650 nm messen kann
Abstrichtupfer mit Baumwoll- oder Rayonspitze
Mikropipette für Volumen bis 200 µl
Einwegröhrchen aus Kunststoff oder Glas
Vortexmischer mit Plattenadapter oder Plattenschüttler

TESTVERFAHREN

8.1 Den Beutel öffnen, die erforderliche Anzahl von Teststreifen entnehmen und in einen Teststreifenhalter geben. Eine Vertiefung für die Negativkontrolle und eine weitere für die Positivkontrolle verwenden. Wenn weniger als 8 Vertiefungen benötigt werden, die erforderliche Anzahl von Vertiefungen abbrechen und die nicht benötigten Vertiefungen wieder in den Beutel mit Trockenmittel geben. DEN BEUTEL WIEDER FEST VERSCHLIESSEN, UM DEN INHALT VOR FEUCHTIGKEIT ZU SCHÜTZEN UND IM KÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN.

8.2 Die Stuhlproben können direkt in die Vertiefungen gegeben oder vor dem Einfügen in die Vertiefungen in Röhrchen verdünnt werden. Zuvor verdünnte Stuhlproben sind bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) bis zu 8 Stunden oder bei 2 - 8 °C bis zu 48 Stunden haltbar und müssen dann getestet werden (siehe unten). Eine der zwei folgenden Methoden auswählen: Siehe Tabelle „**A**“ für Verdünnung in Vertiefungen. Siehe Tabelle „**B**“ für Verdünnung in Röhrchen.

A	**Verdünnung in Vertiefungen**
1	**Unkonservierte, 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. Soviel Flüssigkeit wie möglich herauspressen und Abstrichtupfer entsorgen. Vollpipette in Röhrchen platzieren.
2	**Konservierte oder wässrige unkonservierte Stuhlproben:** Die Proben durch Schütteln der Probenbehälter mischen. Es ist keine weitere Vorbereitung erforderlich.
3	**4 Tropfen** Negativkontrolle in Vertiefung A1 geben. **4 Tropfen** Positivkontrolle in Vertiefung B1 geben.
4	**100 µl** Probenverdünnungspuffer in jede Stuhlprobenvertiefung geben.
5	Mithilfe von Vollpipetten **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.
6	**WEITER MIT SCHRITT 8.3**

B	**Verdünnung in Röhrchen**
1	**Unkonservierte, feste Stuhlproben:** Jeweils ein Röhrchen pro Stuhlprobe beschriften. **1 ml** Probenverdünnungspuffer in jedes Röhrchen geben. **1 Abstrichtupfer** mit Stuhlprobe benetzen und gründlich in Probenverdünnungspuffer rühren. Soviel Flüssigkeit wie möglich herauspressen und Abstrichtupfer entsorgen. Vollpipette in jedes Röhrchen platzieren.
2	**Konservierte oder wässrige unkonservierte Stuhlproben:** Jeweils ein Röhrchen pro Stuhlprobe beschriften. **1 ml** Probenverdünnungspuffer in jedes Röhrchen geben. Die Proben durch Schütteln der Probenbehälter mischen. Mithilfe von Vollpipetten **0,3 ml** (dritte Markierung von der Spitze der Pipette) aufziehen. Probe in Probenverdünnungspuffer geben. Durch einmaliges Hoch- und Herunterziehen mischen. Pipette in Röhrchen belassen. **Verdünnte Stuhlproben sind bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) bis zu 8 Stunden oder bei 2 - 8 °C bis zu 48 Stunden lang haltbar.**
3	**4 Tropfen** Negativkontrolle in Vertiefung A1 geben.
4	**4 Tropfen** Positivkontrolle in Vertiefung B1 geben.
5	Mithilfe von Vollpipetten **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.
6	**WEITER MIT SCHRITT 8.3**

8.3 Die Mikrotiterplatte **abdecken** und **60 Minuten** lang bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren. Mit der Zeitmessung nach dem Hinzufügen der letzten Stuhlprobe beginnen.

8.4 Den Inhalt durch Schütteln oder Absaugen aus den Vertiefungen entfernen. Alle Vertiefungen waschen, indem diese vollständig mit **verdünntem** Waschpuffer (~350 - 400 µl pro Vertiefung) gefüllt werden. Nach jedem Waschen alle Flüssigkeiten aus den Vertiefungen ausschütten oder aspirieren. Insgesamt **3 Mal** waschen. Den Inhalt der Platte nach dem letzten Waschvorgang durch Ausklopfen auf sauberem Papier oder Absaugen entfernen. So viel Waschpuffer wie möglich entfernen. Die Vertiefungen dürfen jedoch niemals vollkommen trocken sein.

8.5 Jeweils **4 Tropfen** (200 µl) Enzymkonjugat in die Vertiefungen geben.

8.6 Die Mikrotiterplatte **abdecken** und **30 Minuten** lang bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.

8.7 Alle Vertiefungen **5 Mal** ausschütteln oder absaugen und waschen (siehe Schritt 8.4).

8.8 Jeweils **4 Tropfen** (200 µl) Farbsubstrat in die Vertiefungen geben.

8.9 Die Mikrotiterplatte **abdecken** und **10 Minuten** lang bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.

8.10 Jeweils **1 Tropfen** (50 µl) Stopplösung in jede Vertiefung geben. Vorsichtig auf die Vertiefungen klopfen oder diese in einem Vortexmischer mischen, bis ein gleichmäßig gelber Farbton entsteht. Die Reaktionen innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung auswerten.

8.11 Reaktionen visuell oder bei 450 nm (eine Wellenlänge) bzw. 450/620 bis 650 nm (zwei Wellenlängen) ablesen.

9 QUALITÄTSKONTROLLE

Positiv- und Negativkontrollen müssen bei jeder Testdurchführung hinzugegeben werden. Sie dienen sowohl als Reagenzien als auch als Verfahrenskontrollen. Die Kontrollen sollen die Reagenzien auf erhebliche Fehler hin überwachen. Die Positivkontrolle ist nicht in der Lage, die Präzision am Cut-off-Wert zu gewährleisten.

Die optische Dichte (O.D.) der Negativkontrolle muss ≤ 0,100 bei 450 nm bzw. < 0,070 bei 450/620 bis 650 nm betragen. Die Negativkontrolle muss beim visuellen Ablesen farblos sein. Wenn in der Negativkontrolle eine gelbe Färbung vorliegt, die 1+ oder höher auf der Kurzanleitung entspricht, muss der Test unter genauer Einhaltung des Waschverfahrens wiederholt werden.

Die optische Dichte der Positivkontrolle muss ≥ 0,300 bei 450 nm oder 450/620 bis 650 nm betragen, nachdem die optische Dichte der Negativkontrolle subtrahiert wurde, und muss beim visuellen Ablesen größer oder gleich der 2+ Reaktion sein. Wenn die gelbe Färbung der Positivkontrolle geringer als 2+ der Kurzanleitung ist, technische Unterstützung hinzuziehen.

10 ERGEBNISSE

Für die Farbauswertung die beiliegende Kurzanleitung einsehen.

VISUELL

10.1 Die Testergebnisse durch Vergleichen mit den Reaktionsfarben der Kurzanleitung ablesen.
Positiv: gelbe Färbung mit einer Intensität von mindestens 1 +
Negativ: farblos

10.2 Auswertung der visuellen Ergebnisse:
Positiv: Wenn sich in der Testvertiefung eine gelbe Färbung mit einer Intensität von mindestens +1 entwickelt, enthält die Probe CSA und der Test ist positiv.
Hinweis: Tests mit blassgelber Färbung (weniger als 1+) müssen wiederholt werden.
Negativ: Eine farblose Reaktion ist ein negatives Ergebnis und bedeutet, dass kein oder eine nicht messbare Konzentration an CSA in der getesteten Probe vorhanden ist.

SPEKTROPHOTOMETRISCH

10.3 Das Ergebnis entweder bei einer Wellenlänge (450 nm) oder bei zwei Wellenlängen (450/620 bis 650 nm) ablesen.

10.4 Die optische Dichte für die Negativkontrolle ablesen.

10.5 Die optiosche Dichte der Negativkontroll-Vertiefung von den optischen Dichten der Vertiefung der Positivkontrolle und den Testvertiefungen subtrahieren, bevor die Ergebnisse ausgewertet werden.
Hinweis: Das Lesegerät kann so eingestellt werden, dass für die Vertiefung der Negativkontrolle ein Leerwert bestimmt wird. Dadurch wird die optische Dichte von der Negativkontroll-Vertiefung automatisch von allen anderen Messwerten subtrahiert. Wenn das Lesegerät nicht über diese Funktion verfügt, den Leerwert gegen Luft bestimmen und die optische Dichte der Negativkontroll-Vertiefung von den optischen Dichten der Vertiefung der Positivkontrolle und den Testvertiefungen subtrahieren, bevor die Ergebnisse ausgewertet werden.

10.6 Ablesen der Testergebnisse:
Positiv: Optische Dichte ≥ 0,050 gegen Leerwert
(d. h. nachdem die optische Dichte der Negativkontrolle subtrahiert wurde)
Negativ: Optische Dichte < 0,050 gegen Leerwert
(d. h. nachdem die optische Dichte der Negativkontrolle subtrahiert wurde)

10.7 Auswertung der spektrophotometrischen Ergebnisse:
Positiv: Wenn die gegen den Leerwert bestimmte optische Dichte in der Testvertiefung größer oder gleich 0,050 ist, enthält die Probe CSA und der Test ist positiv.
Negativ: Eine gegen den Leerwert bestimmte optische Dichte kleiner als 0,050 ist ein negatives Ergebnis

und bedeutet, dass kein oder eine nicht messbare Konzentration an CSA in der getesteten Probe vorhanden ist.

***Hinweis:** Alle Vertiefungen, die visuell klar aussehen, aber eine optische Dichte ergeben, die mit der visuellen Auswertung nicht übereinstimmt, sind als abweichende Werte zu betrachten. Die Vertiefung sollte auf Blasen, kleine Partikel oder einen undurchsichtigen Film auf dem Boden der Vertiefung untersucht werden. Zum Entfernen des Films die Unterseite der Vertiefungen abwischen und die optische Dichte erneut ablesen. Wenn die Diskrepanz zwischen visuellen und spektrophotometrischen Werten fortbesteht, den Test wiederholen.

11 GRENZEN DER METHODE

Die Gültigkeit der Ergebnisse, die mit dem ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay erzielt werden, hängt vom Verlauf der Kontrollreaktionen ab. Siehe **Qualitätskontrolle** in Abschnitt **9**.

Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit des Vorhandenseins von *Cryptosporidien* nicht aus; dieser Fall kann eintreten, wenn die Antigenkonzentration in der Probe unterhalb des messbaren Bereichs des Tests liegt. Eine Korrelation zwischen der Antigenmenge in einer Probe und der klinischen Darstellung konnte nicht nachgewiesen werden.

Wie bei allen diagnostischen IN-VITRO-Tests sind die Ergebnisse zusammen mit den klinischen Befunden und/oder anderen Labortests zu interpretieren.

Die korrekte Gewinnung und Verarbeitung der Stuhlproben sind für die optimale Testdurchführung von größter Bedeutung. Optimale Testergebnisse werden für Stuhlproben erhalten, die möglichst bald nach der Entnahme getestet werden. Siehe **Gewinnung von Stuhlproben** in Abschnitt **7**.

Der ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay wurde als High-Complexity-Test klassifiziert.

12 ERWARTETE WERTE

Die Prävalenz von *Cryptosporidium*-Infektionen variiert innerhalb der verschiedenen Bevölkerungsschichten und geografischen Gebiete. In den USA beträgt die Inzidenz für *Cryptosporidium* ungefähr 0,5 - 3,0 %, wobei die Prävalenzraten für Kinder[12] und homosexuelle Männer[5,6] höher sind.

13 LEISTUNGSDATEN

SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Die Leistungsfähigkeitdes ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assays wurde in klinischen Studien anhand von Proben aus großen Referenz- und klinischen Laboren untersucht, die die parasitologische Untersuchungen (O&P, Ova und Parasiten) durchführten. Insgesamt wurden 214 Proben untersucht; 81 wurden mittels Säurebeständigkeit (AF) positiv auf *Cryptosporidium* getestet, 133 Proben waren negativ. In vierzig der *cryptosporidium*-negativen Stuhlproben wurden mittels AF oder O&P andere Organismen als *Cryptosporidium* festgestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nachstehend aufgeführt:

		Säurebeständigkeit		
		+	–	
ProSpecT	+	81	0	
Cryptosporidium	–	0	133	
		81	133	214

Sensitivität 81/81 = 100 % (95,5 - 100 %)
Spezifität 133/133 = 100 % (97,3 - 100 %)
Die Zahlen in Klammern sind 95%ige Konfidenzintervalle.

Klinische Studien zur Beurteilung der Leistung des ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assays wurden durchgeführt. Die Proben stammten von Krankenhaus-Laboren und Laboren des US-amerikanischen CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Die Patientenpopulationen im Probenpool waren symptomatische Patienten in normalen Prävalenzpopulationen, symptomatische Patienten in einer Population mit hoher Prävalenz (HIV-positiv) und asymptomatische Patienten aus einer Tagesstättenpopulation. Die Proben waren unkonserviert oder in 10 % Formalin oder SAF konserviert. Die Proben wurden entweder mittels Säurebeständigkeit (AF) oder Immunofluoreszenz (IFA) auf *Cryptosporidium* getestet. Insgesamt wurden 212 Proben untersucht; 134 wurden positiv auf *cryptosporidium*-spezifisches Antigen (CSA) getestet und 78 Proben waren negativ. Die Ergebnisse, die mit dem ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay erzielt wurden, sind nachstehend abgebildet:

		Säurebeständigkeit		
		+	–	
ProSpecT	+	130	0	
Cryptosporidium	–	4	78	
		134	78	212

Sensitivität 130/134 = 97 % (92,5 - 99,2 %)
Spezifität 78/78 = 100 % (95,4 - 100 %)
Die Zahlen in Klammern sind 95%ige Konfidenzintervalle.

Eine Prospektivstudie wurde in einem großen Krankenhaus durchgeführt. Hierbei wurden alle in einem Zeitraum von 4 Monaten für die *Cryptosporidium*-Untersuchung mittels Säurebeständigkeit eingereichten Stuhlproben untersucht. Die Proben waren nicht konserviert und waren vor Durchführung des Tests mit dem ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay bei -20 °C tiefgefroren. Die Ergebnisse dieser ersten Tests und die gewonnenen Daten sind nachstehend aufgeführt. Die Daten wurden durch wiederholte Untersuchung der 14 AF-negativen / CSA-positiven Proben gewonnen. Sechs der vierzehn Proben wurden reproduzierbar positiv auf CSA getestet. Tests zur spezifischen Inhibition mit Antikörpern gegen CSA zeigten in allen 6 Proben eine Inhibition von über 50 %. Diese Ergebnisse gehen als richtig positive Proben in die bereinigten Daten ein.

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 Zahlen in Klammern sind 95%ige Konfidenzintervalle.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Mit dem ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay können ungefähr 20 ng/ml CSA nachgewiesen werden.

REPRODUZIERBARKEIT

Der Inter-Assay-Variationskoeffizient (VK, Lauf zu Lauf) des ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assays wurde anhand von 10 positiven Proben mit unterschiedlichen optischen Dichten bestimmt. Jede Probe wurde an fünf Tagen in 10 Vertiefungen pro Tag getestet. Der durchschnittliche Inter-Assay-Variationskoeffizient betrug 10,6 %.

		Säurebeständigkeit		Bereinigt		
		+	–	+	–	
ProSpecT	+	28	14	34	8	
Cryptosporidium	-	1	335	1	335	
		29	349	35	343	378

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient (innerhalb eines Laufs) wurde mit 5 positiven Proben in jeweils 24 Vertiefungen getestet. Der mittlere Intra-Assay-Variationskoeffizient betrug 2,52 %.

KREUZREAKTIVITÄT

Der ProSpecT Cryptosporidium-Mikrotiterplatten-Assay wurde mit Stuhlproben getestet, die für eine Reihe fäkaler Parasiten O&P-positive Ergebnisse erzielten. Mit keiner der unten aufgelisteten infektiösen Agenzien konnten Kreuzreaktionen beobachtet werden.

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

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

14 LITERATURVERWEISE

1. **Alpert, G. u.a., 1986.** Outbreak of Cryptosporidiosis in a Day-Care Centre. Pediatrics 77(2):152-157.
2. **Anon. 1984.** Cryptosporidiosis among children attending day-care centres - Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 33(42):599-601.
3. **Arrowood, M.J. und 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. Cole und J. McLauchlin, 1990.** An enzyme immunoassay for detecting *Cryptosporidium* in faecal and environmental samples. J. Med. Microbiol. 32:233-237.
5. **D'Antonio, R.G. u.a., 1985.** A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. Ann. Intern. Med. 103:886.
6. **Dubey, J.P., C.A. Speer und R. Fayer, Hrsg., 1990.** Cryptosporidiosis of Man and Animals. CRC Press.
7. **Gallaher, M.M. u.a., 1989.** Cryptosporidiosis and Surface Water. Am. J. Public Health 79(1):39-42.
8. **Hayes, E.B. u.a., 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 und R.K. Root, Hrsg., 1988.** Parasitic Infections. Churchill Livingstone.
10. **Navin, T.R. und A.M. Hardy, 1984.** Cryptosporidiosis in Patients with AIDS. J. Infect. Dis. 155:150.
11. **Stehr-Green, J.K. u.a., 1987.** Shedding of Oocysts in immunocompetent individuals infected with *Cryptosporidium*. Am. J. Trop. Med. 1 Hyg 36(2):338-342.
12. **Taylor, J.P. u.a., 1985.** Cryptosporidiosis outbreak in a day-care centre. Am. J. Dis. Child. 139:1023-1025.
13. **Ungar, BLP. 1990.** Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in faecal specimens. J. Clin. Microbiol., 28:2491.

ProSpecT™ ist eine eingetragene Marke von Remel Inc.

Oxoid Ltd Wade Road Basingstoke Hants, RG24 8PW, GB

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an Ihren Händler.

IFU X7591A überarbeitet April 2012