

TRI-COMBO PARASITE SCREEN

A Monoclonal ELISA for Detecting *Giardia*, *Cryptosporidium* and
E. histolytica Antigens in Fecal Specimens

Catalog No. T30408 (96 Tests)

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

ELISA monoclonal para detectar antígenos de *Giardia*,
Cryptosporidium y *E. histolytica* en muestras fecales

N.º de catálogo T30408 (96 ensayos)

IVD Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

Ein monoklonaler ELISA für den Nachweis von *Giardia*,
Cryptosporidium- und *E. histolytica*-Antigen in Stuhlproben

Katalognr. T30408 (96 Tests)

IVD Medizinprodukt für die *In-Vitro*-Diagnostik

Anticorps monoclonal ELISA pour la détection des antigènes
Giardia, *Cryptosporidium* et *E. histolytica* dans des échantillons
de selles

Catalogue N° T30408 (96 tests)

IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

TRI-COMBO PARASITE SCREEN

INTENDED USE

The *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test is an enzyme immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and/or *E. histolytica* antigen in human fecal specimens. The test is indicated for use as a screen for fecal specimens from patients with gastrointestinal illness including dysentery to aid in the diagnosis of enteric infection resulting from giardiasis, cryptosporidiosis and amebiasis. The *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test serves as a screen to rule out negative specimens and reduce the number of specimens that require additional follow-up testing.

EXPLANATION

Giardia is a binucleated, flagellated protozoan parasite which exists in two forms: a non-infectious, pear-shaped trophozoite (9 to 21 μm) inhabiting the small intestine and the highly-infectious cyst form, which is elliptical in shape and ranges in size from 8 to 12 μm (reviewed in 1). Survival outside its host varies greatly between the two forms: the trophozoite, which is extremely labile, lasts only a matter of hours outside the body, while the cyst form may survive for several days in an external environment (1). *Giardia* often is responsible for infections due to water contamination, and travelers have been found to contract giardiasis from endemic areas. Transmission also occurs by direct contact, especially with asymptomatic carriers and by food contamination. Giardiasis is known to be a common sexually-transmitted disease (2). Animal fecal contamination, especially of water, is another route of transmission in humans (1).

Clinical manifestations of giardiasis range from asymptomatic carriage with the passing of cysts to chronic debilitating diarrhea, weight loss and malabsorption. High-risk categories include young children, immunocompromised patients and those without previous exposure (1).

Cryptosporidium is a protozoan parasite of vertebrates originally thought to cause diarrhea only in animals (3). In 1976, the first human infection was reported (4). Since then, *Cryptosporidium* spp. has been found to be associated with diarrheal illness in most parts of the world and is a frequent cause of traveler's diarrhea. The disease is transmitted by the thick-walled oocyst form, 2-6 μm in diameter, which is remarkably resistant to common disinfectants and routine chlorination of drinking water. Person-to-person transmission, especially among children, is common. *Cryptosporidium* has little or no host specificity, and animals such as rodents, cattle and domestic pets can serve as a reservoir for zoonotic transmission to humans, transmission occurring either by direct contact or by contamination of water supplies with fecal matter. Cryptosporidiosis is a serious opportunistic infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and is potentially a sexually transmitted disease (5,6).

Clinical manifestations of cryptosporidiosis include cholera-like diarrhea, abdominal pain, nausea, vomiting and weight loss. In normally healthy persons, the infection is usually self-limiting and of short term. In AIDS and other immunocompromised patients, cryptosporidiosis can result in prolonged and life-threatening illness due to excessive fluid loss (7). In these patients the infection may also spread to the respiratory and biliary tracts (5).

The life cycle of *Entamoeba histolytica* is similar to that observed with other amoebae. The organism exists either as a trophozoite, ranging from 10-60 μm in diameter, or as a cyst (12-15 μm) (8). Humans serve as the primary reservoir, with the organism being spread through ingestion of contaminated food and water or through sexual contact. The cyst is very stable. Once it enters the intestine, it begins to divide into trophozoites that bind to the intestinal mucosa via a galactose or N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin referred to as the galactose adhesin. Once the trophozoites have attached, they release tissue-damaging enzymes and proteins that lyse the mucosal cells. The galactose adhesins of *E. histolytica* and *E. dispar* cross-react serologically but contain distinct epitopes.

The adhesin is antigenically conserved, but monoclonal antibodies are used to distinguish between the adhesin from pathogenic *E. histolytica* and non-pathogenic *E. dispar* (reviewed in 9).

E. histolytica and *E. dispar* are intestinal parasites that infect approximately half a billion people worldwide annually (10). Only malaria and schistosomiasis are believed to be more prevalent parasitic causes of morbidity and mortality. Of the huge number of persons infected, most are infected with *E. dispar*, which has not been associated with disease. Infection with *E. dispar* rather than *E. histolytica* is believed to explain, at least in part, the low prevalence of disease considering the high rate of infection. Even so, it is estimated that approximately 10% of the half billion people infected each year are infected with *E. histolytica*. These individuals can become symptomatic and develop colitis and liver abscesses, resulting in a mortality rate estimated between 40,000 and 120,000 persons annually. It is necessary to distinguish between the two species because *E. histolytica* is pathogenic, whereas *E. dispar* is not associated with colitis or liver abscess. Inaccurate diagnosis may result in unwarranted and unnecessary treatment with harsh drugs with side effects.

Patients with pathogenic *E. histolytica* may show a wide range of conditions. Some are completely asymptomatic. These persons may shed millions of cysts daily, representing a potential reservoir for dissemination. Some patients may show mild diarrhea that develops into bloody diarrhea with abdominal cramps, eventually resulting in fulminant colitis. Because of the tissue damage that can occur, perforation of the intestine may result and the amoebae may disseminate to other parts of the body. Approximately 10% of persons with invasive amebiasis develop liver abscesses (10).

The most common method used to detect giardiasis, cryptosporidiosis and amebiasis has been diagnosis by O&P microscopy. However, accuracy of O&P results depends upon the skill of the technician and also relies on the presence of intact cysts in the feces, which may not be present in all samples. In addition, it is only rarely possible to distinguish between the pathogenic and non-pathogenic species of *Entamoeba* using microscopy. The success rate of fecal examination by microscopy varies between 50 and 70%, and multiple specimens are usually necessary to establish a diagnosis. When infection is present but parasites are not detected by microscopy, sampling and testing of duodenal fluid may detect trophozoites, but this method is invasive and expensive. Detection of the organism and antigens by ELISA provides an alternative method of diagnosis and is sensitive and specific (9). The ELISA procedure is straightforward to perform and exhibits increased sensitivity compared to microscopic examination. Large numbers of specimens can be tested rapidly and objectively, and the procedure is less labor-intensive than most microscopy methods.

PRINCIPLE OF THE TEST

The **TRI-COMBO PARASITE SCREEN** test uses monoclonal and polyclonal antibodies to cell-surface antigens of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *E. histolytica*. The microassay plate in the kit contains immobilized monoclonal antibodies against the antigens, and the *Conjugate* consists of polyclonal antibodies against the antigens. In the assay, an aliquot of a diluted fecal specimen is transferred to a microassay well. The immobilized monoclonal antibodies bind the *Giardia*, *Cryptosporidium* and/or *E. histolytica* antigens if they are present. Upon addition, *Conjugate* then binds to the antigen/antibody complex. Any unbound materials are removed during the washing steps. Following the addition of *Substrate*, a color is detected due to the enzyme-antibody-antigen complexes that formed in the presence of antigens and conjugate.

MATERIALS PROVIDED

- CONJENZ** **Conjugate (7 mL)** – Antibodies against antigens of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *E. histolytica* in a buffered protein solution containing 0.02% Thimerosal
- DIL SPE** **Diluent (50 mL)** – Buffered protein solution containing 0.02% thimerosal. The *Diluent* is also to be used as the negative control solution (see TEST PROCEDURE)
- H₂SO₄0.6N** **Stop Solution (7 mL)** – 0.6 N sulfuric acid. CAUTION: Avoid contact with skin; flush with water immediately if contact occurs
- CONTROL+** **Giardia Positive Control (3.5 mL)** – *Giardia* antigen in a buffered protein solution with 0.02% thimerosal.

CONTROL+	Cryptosporidium Positive Control (3.5 mL) – <i>Cryptosporidium</i> antigen in a buffered protein solution with 0.02% thimerosal
CONTROL+	E. histolytica Positive Control (3.5 mL) – <i>E. histolytica</i> antigen in a buffered protein solution with 0.02% thimerosal
SUBS/REAG	Substrate (14 mL) – solution containing tetramethylbenzidine and peroxide
WASHBUF/20X	Wash Buffer Concentrate (50 mL) – 20X concentrate containing phosphate buffered saline, detergent, and 0.2% thimerosal
MA/PLT	Microassay Plate – 12 strips, each consisting of 8 wells coated with antibodies to <i>Giardia spp.</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i> , and <i>E. histolytica</i> antigen (stored with desiccant)
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device

ACCESSORIES

100 Disposable plastic transfer pipettes 2 Plastic adhesive sheets 1 Wash Solution Label

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Squirt bottle for wash reagent	Vortex mixer
950 mL distilled water for diluting wash reagent	Discard container
Absorbent paper	Applicator sticks
ELISA reader capable of reading at 450 nm or 450/620 nm	
Small tubes for dilution of fecal specimens (e.g., microcentrifuge tubes)	

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of this kit is given on the box label. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit should be stored between 2° and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

PRECAUTIONS

- Each component in the kit should be inspected for any signs of leakage. Upon arrival, the kit should be inspected to ensure that components are not frozen or warm to the touch due to improper shipping conditions.
- Reagents from different kits should not be mixed. Do not use a kit past the assigned expiration date.
- Bring all components to ROOM TEMPERATURE BEFORE USE!
- Do not freeze the reagents. The kit should be stored between 2°C and 8°C.
- Caps and tips are color-coded; do NOT mix or interchange!
- When handling assay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
- Unused microwells must be placed back inside of the resealable pouch with the desiccant to protect them from moisture. Check the desiccant pack before using the microwells. The color indicator on the desiccant pack should be blue. If the color turns pink, the quality of the microwells may be compromised. Please do not use microwells stored with pink desiccant.
- Hold reagent bottles vertically when dispensing to ensure proper drop size and correct volume.
- Handle specimens and used microassay wells as if capable of transmitting infectious agents. Wear gloves when performing the test.
- Reagents contain 0.02% thimerosal as a preservative and should be handled with normal laboratory caution.
- Microbial contamination of reagents may decrease the accuracy of the assay. Avoid microbial contamination of reagents by using sterile disposable pipettes if removing aliquots from reagent bottles.
- All reagents, with the exception of the *Wash Buffer Concentrate*, are supplied in ready-to-use bottles. Reagents can be dispensed directly from the dropper bottles or decanted for use with multichannel pipettes. If excess reagent has been decanted, the excess should be

discarded. Do not pour back into the bottle. The *Substrate* should be stored in and used from the light-protected bottle in which it is supplied. If an aliquot is removed from the original bottle for any reason, do not return unused *Substrate* to the original bottle.

- Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
- The *Stop Solution* contains 0.6 N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact with skin or eyes occurs.
- The *Substrate* is light sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources.
- The test has been optimized for sensitivity and specificity. Do not deviate from the specified procedure. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test.
- Fecal 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."

PRELIMINARY PREPARATIONS

- All reagents must be at room temperature prior to use in the assay.**
- Prepare 1X Wash Solution.** The *Wash Buffer Concentrate* is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed). It should be diluted to a total volume of 1 liter by adding 50 mL of the concentrate to 950 mL of distilled water. The 1X *Wash Solution* can be stored between 2° and 8°C.
- Assay Strip Preparation.** Each strip contains 8 wells coated with antibodies to *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, and *E. histolytica* antigen. Each specimen or control will use one of these coated wells. Determine the number of wells to be used. Avoid contact with the base of the wells. Assay wells not used must be returned to the foil pouch and carefully resealed with desiccant.

SPECIMEN HANDLING AND PREPARATION

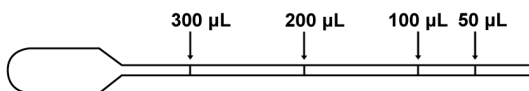
Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens are appropriate. No modification of collection methods used for standard microscopic O&P examinations is needed.

Acceptable Sample Types
Fresh Fecal Specimen
Frozen Fecal Specimen (frozen undiluted samples)

Do Not Use
Fecal specimens in Formalin-based fixative (e.g., sodium acetate formalin, 10% formalin)
Fecal specimens in alcohol-based fixative (e.g., polyvinyl alcohol)
Concentrated Fecal Specimens

- Specimens should be kept between 2° and 8° C and tested within 24 hours of collection. Specimens that cannot be tested within this time should be stored at ≤ -10°C until tested. Repeated freeze/thaw cycles should be avoided. If using frozen specimens, thaw at room temperature.
- Set up and label one test tube for each sample as necessary.
Add 400 µL Diluent to each tube.
- Obtain one disposable plastic transfer pipette (supplied with the kit) for each sample.

Transfer Pipette



4. **Mix all specimens and cultures thoroughly regardless of consistency - it is essential that the samples be evenly suspended before sampling.** Using the disposable plastic transfer pipette, add 100 μ L (second graduation mark) of fecal specimen to the tube containing *Diluent* and mix well. If the specimen cannot be pipetted, use an applicator stick to transfer approximately 0.1 g of feces. This is about the size of a small pea (about 4mm in diameter).
5. Close each tube of diluted sample and mix thoroughly. Proper mixing can be achieved by vortexing or inverting the tube several times.
6. If using semi-automated or automated washing equipment, once diluted, specimens must be centrifuged (5000 x g for 10 minutes) to remove any particulate matter from the supernatant before transfer to assay wells.

TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents and the required number of test strips to room temperature before use.
2. **Prepare Controls**
 - a. Positive Controls – shake each *Positive Control* bottle for several seconds, then add one drop to each positive control well.
 - b. Negative Controls – add 100 μ L of *Diluent* to an additional well to serve as the negative control.
3. **Using a new transfer pipette for each specimen, transfer 100 μ L of diluted specimen to the assay well of the *Microassay Plate*.**
4. Cut the adhesive plastic sheet to the size necessary to cover the wells. **Cover the wells and incubate them at for 1 hour at room temperature.**
5. Shake out contents of assay wells into a discard pan.
6. **Wash each well using the 1X Wash Solution in a squirt bottle with a fine-tipped nozzle,** directing the *Wash Solution* to the bottom of the well with force. Fill the wells, and then shake the **Wash Solution** out of the well into a discard pan. Slap the inverted plate on a dry paper towel.
Note: If using semi-automated or automated washing equipment, add 350 μ L of 1X Wash Solution to each well. Wash for a total of 5 times
7. Repeat step 6 four additional times using a dry paper towel each time. If any particulate matter is seen in the wells, continue washing until all the particulate matter is removed.
8. After washing, completely remove any residual liquid in the wells by striking the plate onto a dry paper towel until no liquid comes out. Dispose of paper towels and specimen containers properly.
9. **Add 1 drop (50 μ L) of *Conjugate* (red cap) to each well.**
10. Seal with a plastic adhesive sheet and gently tap to mix. **Incubate the wells for 30 minutes at room temperature.**
11. After incubating, **repeat the washing procedure described in steps 5-8.**
12. **Add 2 drops (100 μ L) of *Substrate* (blue cap) to each well.** Gently tap the wells to mix the substrate. Incubate the wells at room temperature for 10 minutes. Gently tap the wells at 5 minutes.
13. **Add 1 drop (50 μ L) of *Stop Solution* (yellow cap) to each well.** Gently tap the wells and wait 2 minutes before reading. The addition of the *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color which may be quantitated by measuring the optical density at 450 nm on a microplate ELISA reader. The instrument should be blanked against air. If a dual wavelength reader is used, blank against air at 620 and read at 450 nm. Wipe the underside of each well before measuring the optical density. If an ELISA reader is unavailable, the test may be read visually in good light against a white background. Read within ten minutes after adding *Stop Solution*.

QUALITY CONTROL

1. Positive and negative controls must be run with each series of test specimens. The positive controls demonstrate that the assay is functioning properly for the detection of each parasite antigen in fecal specimens. The negative control demonstrates that the assay is not reacting nonspecifically.
2. Positive and negative controls must fall within their respective ranges or the test results are not valid.
 - a) **Positive Control must be a visible yellow color.** If read on a spectrophotometer, the OD at 450 nm or using dual wavelength at 450/620 nm must be ≥ 0.500 . Any well that gives a positive reading without visible color should be repositioned, wiped on the underside of the well, and read again.
 - b) **Negative Control must be visually clear.** If read on a spectrophotometer, the OD at 450 nm must be < 0.200 . If read at 450/620 nm the absorbance must be < 0.160 . If not, the test is invalid and should be repeated, paying attention to the wash procedure.
3. Visual readings must be taken in good light against a white background.
4. Test results are not valid unless the performance characteristics of the positive and negative controls are met. If these results are not observed, call Technical Services.

INTERPRETATION OF RESULTS

	Spectrophotometric Reading	
	Single Wavelength at 450 nm	Dual Wavelength at 450/620 nm
Negative	OD < 0.200	OD < 0.160
Positive	OD ≥ 0.200	OD ≥ 0.160

Visual Interpretation

The negative control well should be colorless or have only a faint yellow color. The positive control well should give an obvious yellow color. If these results are not observed, call Technical Services. A test sample is considered positive if it has an obvious yellow color when compared to the negative control well. It may be less yellow or more yellow than the color observed in the positive control well. A test sample is considered negative if the reaction is colorless or less yellow than the negative control well.

A positive result indicates that antigen from *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and/or *E. histolytica* is present in the specimen. A negative result indicates that *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and/or *E. histolytica* antigens are absent or the level is below the detection limit of the test.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The **TRI-COMBO PARASITE SCREEN** test detects the presence of *Giardia*, *Cryptosporidium* and/or *E. histolytica* antigens in fecal specimens. Test results should be taken under consideration by the physician in light of the clinical history and physical examination of the patient.
2. The **TRI-COMBO PARASITE SCREEN** test is intended for the qualitative detection of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and/or *E. histolytica* antigens in unpreserved fecal specimens. The intensity of the color should not be interpreted quantitatively.
3. Concentrated fecal specimens should not be used in the test and may not give accurate results.

EXPECTED VALUES

Normal healthy individuals should not be infected with *Giardia*, *Cryptosporidium* or *E. histolytica* and should test negative in the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test. A positive test result in the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test indicates that the person is shedding detectable amounts of *Giardia*, *Cryptosporidium* and/or *E. histolytica* antigen. The incidence of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *E. histolytica* infection varies significantly between populations and geographic regions. Children in daycare settings have exhibited higher rates of infection with *Giardia* than the general population (11). In addition, homosexual men have shown higher rates of infection (9,12). In general, laboratory-confirmed incidence of cryptosporidiosis in developed countries ranges from 1 to 2% overall with a higher incidence in children. It is estimated that *Entamoeba histolytica* infects about 50 million people around the world (9). Roughly 90% of these persons remain asymptomatic, whereas about 10% develop clinical symptoms ranging from gastrointestinal disease to liver abscesses. High risk groups include persons who have traveled abroad, immigrants, immunocompromised persons, migrant workers, and active male homosexuals (9,14). Nonpathogenic strains (*E. dispar*) are predominant among male homosexuals (15). The disease often is transmitted by asymptomatic carriers of *E. histolytica*.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test was compared to a panel of single parasite detection predicate devices (for the detection of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *E. histolytica*), and included 275 fresh and 645 frozen specimens. The following table shows a summary of the clinical performance of the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test to the predicate panel. The results show that the test exhibited a positive percent agreement of 97.8%, negative percent agreement of 97.5% and overall percent agreement of 97.6%.

n = 920	Predicate Panel Positive	Predicate Panel Negative
TRI-COMBO Positive	307	15
TRI-COMBO Negative	7	591

	95% Confidence Limits	
Positive Agreement	97.8%	95.3 – 99.0%
Negative Agreement	97.5%	95.9 – 98.6%
Overall Agreement	97.6%	97.3 – 97.8%

REPRODUCIBILITY

The reproducibility of the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test was determined using 20 human fecal specimens coded to prevent their identification during testing. Testing was performed at 2 independent laboratories and on-site at TECHLAB®, Inc. The samples were tested twice a day over a 5-day period by multiple technicians at each site using 2 different kit lots. Positive and negative controls were run with each panel of the masked samples. The results from each laboratory were submitted to TECHLAB®, Inc. and compared with in-house results. The results were consistent among the different locations and exhibited a correlation of 100%. The samples produced the expected results 100% of the time.

CROSS REACTIVITY

The *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test was evaluated for cross-reactivity with the bacterial and viral strains listed below. None of the strains were shown to interfere with the performance of the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i> ETEC
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Salmonella enterica typhimurium</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Cowans
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> EIEC	<i>Yersinia enterocolitica</i>

Adenovirus, Type 1, 2, 3, 5, 40, and 41	Echovirus, Type 9, 11, 18, 22, and 33
Coronavirus, Human	Enterovirus, Type 68, 70, and 71
Coxsackievirus, Type, B2, B3, B4, and B5	Rotavirus, Human

INTERFERING SUBSTANCES (U.S. FORMULATIONS)

The following substances had no effect on positive or negative test results analyzed at the concentrations indicated: Hog gastric mucin (3.5% w/v), Human blood (40% v/v), Barium sulfate (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), Mylanta (5% v/v), Steric/Palmitic Acid (40% w/v), Metronidazole (0.25% w/v), Vancomycin (0.25% w/v).

PRECISION – INTRA-ASSAY

For the determination of intra-assay performance, 6 positive and 5 negative fecal specimens were analyzed. Each specimen was assayed in replicates of eight. All positives remained positive and all negatives remained negative.

PRECISION – INTER-ASSAY

The inter-assay precision of the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test was determined by using 20 fecal specimens (8 negative, 4 *Giardia* positive, 4 *Cryptosporidium* positive, and 4 *E. histolytica* positive). The samples were tested, twice a day over a 5-day period using 2 different kit lots. Positive and negative controls were run on each day. All positive samples remained positive and all negative samples remained negative.

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity of the test was determined by using purified cyst or trophozoite dilution curves in a sample matrix. The concentration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts and *E. histolytica* trophozoites (Pathogenic Zymodeme Amoeba [PZ]) where specimens were positive by the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test 95% of the time was utilized to describe the assay limit-of-detection (LOD). Test results determined the LOD for the assay to be 8,000 cysts/mL for *Giardia* (equivalent to 160 cysts detected per test), 40,000 oocysts/mL for *Cryptosporidium* (equivalent to 800 oocysts detected per test), and 3,300 PZ/mL for *E. histolytica* (equivalent to 66 PZs detected per test). Because the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test detects soluble antigen in fecal specimens in addition to cysts, oocysts, and trophozoites, this LOD study represents an estimate of analytical sensitivity based on purified cysts, oocysts, and trophozoites.

TRI-COMBO PARASITE SCREEN – ESPAÑOL

USO PREVISTO

El ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa simultánea de antígenos de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium* y/o *E. histolytica* en muestras fecales humanas. El ensayo está indicado para uso como cribado en muestras fecales de pacientes con enfermedades gastrointestinales, incluida la disentería, para facilitar el diagnóstico de las infecciones entéricas, como giardiasis, criptosporidiasis y amebiasis. El ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* sirve como cribado para descartar muestras negativas y reducir el número de muestras que precisan pruebas adicionales de seguimiento.

FUNDAMENTO

Giardia es un parásito protozoario, binucleado, flagelado, que existe en dos formas: un trofozoíto no infeccioso con forma de pera (9 a 21 µm) que habita en el intestino delgado y la forma de quiste, altamente infecciosa, de forma elíptica y un tamaño de 8 a 12 µm (revisada en 1). La supervivencia fuera del hospedador varía en gran medida entre ambas formas: el trofozoíto, que es extremadamente lábil, sólo vive algunas horas fuera del organismo, mientras que el quiste puede sobrevivir durante varios días en un ambiente externo (1). *Giardia* a menudo es responsable de infecciones debidas a la contaminación del agua y algunos viajeros han contraído giardiasis en zonas endémicas. La transmisión también ocurre por contacto directo, especialmente a partir de portadores asintomáticos, y por contaminación alimentaria. Se sabe que la giardiasis es una enfermedad frecuente de transmisión sexual (2). La contaminación fecal animal, especialmente del agua, es otra vía de transmisión en seres humanos (1).

Las manifestaciones clínicas de giardiasis abarcan desde los portadores asintomáticos con emisión de quistes a las diarreas debilitantes crónicas, pérdida de peso y malabsorción. Las categorías de alto riesgo incluyen a los niños, los pacientes inmunocomprometidos y las personas con una exposición anterior (1).

Cryptosporidium es un parásito protozoario de los vertebrados; anteriormente se pensaba que causaba diarrea solo en animales (3). En 1976 se notificó el primer caso de infección en seres humanos (4). Desde entonces, se ha observado que las especies de *Cryptosporidium* se asocian a enfermedad diarreica en la mayor parte del mundo y son una causa frecuente de diarrea del viajero. La infección se transmite por el ovoquiste de pared gruesa, de 2-6 µm de diámetro, que presenta una gran resistencia a los desinfectantes comunes y a la cloración rutinaria del agua potable. La transmisión persona a persona, especialmente entre niños, es común. *Cryptosporidium* tiene poca o ninguna especificidad de huésped; los roedores, las reses y los animales domésticos pueden actuar como reservorio para la transmisión zoonótica al ser humano que se produce ya sea por contacto directo o por contaminación de los suministros de agua por materia fecal. La criptosporidiasis es una infección oportunista grave en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y es una enfermedad de posible transmisión sexual (5,6).

Las manifestaciones clínicas de la criptosporidiasis incluyen diarrea coleriforme, dolor abdominal, náuseas, vómitos y pérdida de peso. En personas sanas, la infección es habitualmente autolimitada y de corta duración. En pacientes con SIDA y otros tipos de inmunodeficiencia, la criptosporidiasis puede causar una enfermedad prolongada y potencialmente mortal por la pérdida excesiva de líquidos (7). En estos pacientes, la infección puede también propagarse a las vías respiratorias y biliares (5).

El ciclo vital de *Entamoeba histolytica* es parecido al de otras amebas. El organismo existe como trofozoíto, de 10 a 60 µm de diámetro, o como quiste (12-15 µm) (8). Los seres humanos son el reservorio principal y el organismo se propaga a través de la ingestión de alimentos y agua contaminados o por contacto sexual. El quiste es muy estable. Una vez que se introduce en el intestino, comienza a dividirse en trofozoítos que se unen a la mucosa intestinal mediante una galactosa o una lectina que se une a la N-acetil-D-galactosamina, denominada adhesina galactosa. Una vez que los trofozoítos se han fijado, liberan enzimas y proteínas que dañan los tejidos y destruyen las células mucosas. Las adhesinas galactosa de *E. histolytica* y *E. dispar*

presentan reactividad serológica cruzada, aunque tienen epítomos diferenciados. La adhesina se conserva antigénicamente, pero se utilizan anticuerpos monoclonales para distinguir entre la adhesina de la *E. histolytica* patógena y la de la *E. dispar* no patógena (revisado en 9).

E. histolytica y *E. dispar* son parásitos intestinales que infectan aproximadamente a 500 millones de personas anualmente en todo el mundo (10). Se considera que solo malaria y la esquistosomiasis son infecciones parasitarias con una prevalencia superior de morbilidad y mortalidad. Del elevado número de personas infectadas, la mayor parte resulta infectada con *E. dispar*, que no se ha asociado a ninguna enfermedad. Se cree que la infección por *E. dispar*, más que por *E. histolytica* explica, al menos parcialmente, la baja prevalencia de enfermedades si se tiene en cuenta la elevada tasa de infección. Aun así, se estima que aproximadamente el 10 % de los 500 millones de personas infectadas cada año están infectados por *E. histolytica*. Estas personas pueden presentar síntomas y desarrollar colitis y abscesos hepáticos, que tienen como consecuencia una tasa de mortalidad anual de entre 40 000 y 120 000 personas. Es necesario distinguir entre las dos especies porque *E. histolytica* es patógena, mientras que *E. dispar* no se asocia a colitis o absceso hepático. El diagnóstico inexacto puede tener como resultado un tratamiento injustificado e innecesario con fármacos potentes con efectos secundarios.

Los pacientes infectados con *E. histolytica* patogénica pueden presentar una amplia variedad de enfermedades. Algunos están completamente asintomáticos. Estas personas pueden eliminar diariamente millones de quistes y representan un reservorio potencial para la diseminación. Algunos pacientes pueden presentar una diarrea leve que evoluciona a diarrea sanguinolenta con cólicos, que finalmente se convierte en una colitis fulminante. A causa del daño tisular, puede producirse una perforación intestinal con la diseminación de la ameba a otras partes del cuerpo. Aproximadamente el 10 % de las personas con amebiasis invasiva desarrollan abscesos hepáticos (10).

El método más común para detectar giardiasis, cryptosporidiasis y amebiasis ha sido el diagnóstico mediante microscopía de huevos y parásitos. Sin embargo, la exactitud de los resultados de huevos y parásitos depende de la habilidad del técnico y también se basa en la presencia de quistes intactos en las heces, que podrían no estar presentes todas las muestras. Además, sólo rara vez es posible distinguir entre las especies patogénicas y no patogénicas de *Entamoeba* mediante microscopía. La tasa de éxito del análisis fecal mediante microscopía oscila entre el 50 % y el 70 % y habitualmente se requieren múltiples muestras para establecer el diagnóstico. Cuando la infección está presente, pero no se detectan parásitos mediante microscopía, la toma de muestras y el análisis del líquido duodenal puede detectar trofozoitos, pero este método es invasivo y caro. La detección del organismo y los antígenos mediante ELISA proporciona un método alternativo de diagnóstico y es sensible y específico (9). El procedimiento de ELISA es sencillo de realizar y más sensible en comparación con el análisis microscópico. Se pueden analizar con rapidez y objetividad gran número de muestras y el procedimiento es menos laborioso que la mayoría de métodos microscópicos.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo **TRI-COMBO PARASITE SCREEN** utiliza anticuerpos monoclonales y policlonales frente a antígenos de la superficie celular *Giardia*, *Cryptosporidium* y *E. histolytica*. La placa de microensayo del kit contiene anticuerpos monoclonales inmovilizados contra los antígenos y el *Conjugado* consiste en anticuerpos policlonales contra los antígenos. En el ensayo, una alícuota de una muestra fecal diluida se transfiere a un pocillo de microanálisis. Los anticuerpos monoclonales inmovilizados se unen a los antígenos de *Giardia*, *Cryptosporidium* y/o *E. histolytica* si están presentes. Al añadirlo, el *Conjugado* se une entonces al complejo antígeno/anticuerpo. Cualquier material no unido se retira durante los pasos de lavado. Tras añadir el *sustrato*, se detecta un color debido a los complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia de antígenos y conjugado.

MATERIALES SUMINISTRADOS

CONJ|ENZ

Conjugado (7 ml) – Anticuerpos frente a antígenos de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium* y *E. histolytica* en una solución proteínica tamponada con tiomersal al 0,02 %

DIL | SPE

Diluyente (50 ml) – Solución proteínica tamponada con tiomersal al 0,02 %. El *diluyente* también se usa como solución de control negativo (véase PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA).

H₂SO₄|O.6N

Solución de parada (7 ml) – ácido sulfúrico 0,6 N. ATENCIÓN: Evitar el contacto con la piel; aclarar inmediatamente con agua en caso de contacto.

CONTROL+|

Control positivo de Giardia (3,5 ml) – antígeno de *Giardia* en una solución proteínica tamponada con tiomersal al 0,02 %

CONTROL+|

Control positivo de Cryptosporidium (3,5 ml) – antígeno de *Cryptosporidium* en una solución proteínica tamponada con tiomersal al 0,02 %

CONTROL+|

Control positivo de E. histolytica (3,5 ml) – antígeno de *E. histolytica* en una solución proteínica tamponada con tiomersal al 0,02 %

SUBS|REAG

Sustrato (14 ml) – solución que contiene tetrametilbenzidina y peróxido

WASHBUF|20X

Tampón de lavado concentrado (50 ml) – concentrado 20X con solución salina tamponada con fosfato, detergente y tiomersal al 0,2 %

MA|PLT

Placa de microensayo – 12 tiras, cada una con 8 pocillos recubiertos con anticuerpos frente a antígenos de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium* y *E. histolytica* (conservados con desecante)

IVD

Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

ACCESORIOS

100 pipetas de plástico desechables 2 Hojas de plástico adhesivo

1 etiqueta de solución de lavado

MATERIALES Y EQUIPAMIENTO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Frasco con rociador para el reactivo de lavado

Mezclador de tipo vórtex

950 ml de agua destilada para diluir el reactivo de lavado

Contenedor desechable

Papel absorbente

Lector de ELISA capaz de leer a 450 nm o 450/620 nm

Tubos pequeños para la dilución de muestras fecales (p. ej., Varillas aplicadoras

tubos de microcentrifuga)

PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta de la caja. Las fechas de caducidad de los componentes se indican en sus correspondientes etiquetas. El kit debe conservarse entre 2 y 8 °C y debe devolverse a la nevera tan pronto como sea posible después del uso.

PRECAUCIONES

1. Cada componente del kit debe inspeccionarse por cualquier posible signo de fuga. Al recibirlo, el kit debe inspeccionarse para comprobar que los componentes no están congelados ni calientes al tacto debido a condiciones de envío inadecuadas.
2. No deben mezclarse los reactivos de kits diferentes. No utilice los kits después de la fecha de caducidad asignada.
3. ANTES DEL USO, deje que todos los componentes alcancen la TEMPERATURA AMBIENTE.
4. No congele los reactivos. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C.
5. Los tapones y las puntas están codificados con colores y NO deben mezclarse ni intercambiarse.
6. Cuando se manipulen pocillos de ensayo, evitar el rascado del fondo de los pocillos, ya que esto podría causar lecturas de absorbancia elevadas.
7. Los micropocillos no utilizados se introducirán en la bolsa resellable junto con el desecante para protegerlos de la humedad. Comprobar la bolsa de desecante antes de utilizar los

micropocillos. El indicador de color de la bolsa de desecante debe estar azul. Si el color vira a rosa, puede estar comprometida la calidad de los micropocillos. No utilizar los micropocillos almacenados con desecante rosa.

8. Al añadirlos, sujete los frascos de los reactivos en posición vertical para asegurar el tamaño adecuado de las gotas y corregir el volumen en caso necesario.
9. Manipular las muestras y los pocillos de microanálisis utilizados como potenciales transmisores de agentes infecciosos. Utilizar guantes para realizar la prueba.
10. Los reactivos contienen tiomersal al 0,02 % como conservante y se manipularán según las normas habituales de precaución de laboratorio.
11. La contaminación microbiana de los reactivos puede reducir la precisión del análisis. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos utilizando pipetas estériles desechables para extraer partes alícuotas de los frascos de reactivos.
12. Todos los reactivos, a excepción del *Tampón de lavado concentrado*, se suministran en frascos listos para usar. Los reactivos pueden dispensarse directamente de los frascos con gotero o decantarse para su uso con pipetas multicanal. Si se ha decantado una cantidad excesiva de reactivo, deberá desecharse el sobrante. No se reintroducirá en el frasco. El *Sustrato* debe almacenarse y utilizarse del frasco protegido de la luz en el que se suministra. Si, por cualquier motivo, se retira una parte alícuota del frasco original, no debe reintroducirse el *Sustrato* no utilizado en el frasco original.
13. Efectuar el procedimiento de lavado según las indicaciones para evitar reacciones de fondo elevadas.
14. La *Solución de Parada* contiene ácido sulfúrico 0,6 N. Aclarar con agua inmediatamente en caso de contacto con la piel o los ojos.
15. El *Sustrato* es sensible a la luz y debe protegerse de la luz solar directa o de fuentes de UV.
16. La prueba se ha optimizado para mejorar la sensibilidad y la especificidad. No se desvíe del procedimiento especificado. Las alteraciones del procedimiento especificado o de las condiciones de la prueba pueden afectar a su sensibilidad y especificidad.
17. Las muestras fecales pueden contener agentes potencialmente infecciosos y deben manejarse en un "Nivel de Bioseguridad 2", tal como se recomienda en el Manual de los CDC/NIH, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories".

PREPARACIONES PRELIMINARES

1. **Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de su uso en el análisis.**
2. **Preparar Solución de lavado 1X.** El *Tampón de lavado concentrado* se suministra como concentrado 20x (se puede apreciar un precipitado). Se debe diluir hasta un volumen total de 1 litro añadiendo 50 ml del concentrado a 950 ml de agua destilada. La *solución de lavado 1x* puede conservarse entre 2 y 8 °C.
3. **Preparación de la tira de análisis.** Cada tira contiene ocho pocillos recubiertos con anticuerpos frente a antígenos de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium* y *E. histolytica*. Se empleará uno de estos pocillos recubiertos para cada muestra o control. Determinar el número de pocillos que se van a utilizar. Evitar el contacto con la base de los pocillos. Los pocillos de análisis no utilizados deben volver a colocarse en la bolsa de aluminio y resellarse con cuidado con desecante.

MANIPULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

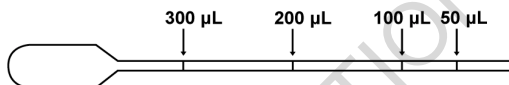
Los procedimientos estándar internos de recogida y manipulación de las muestras fecales se consideran adecuados. No se necesita ninguna modificación de los métodos de recogida utilizados para los exámenes microscópicos estándar de huevos y parásitos.

Tipos de muestra aceptables
Muestras fecales recientes
Muestra fecal congelada (Muestras congeladas no diluidas)

No utilizar
Muestras fecales en fijador basado en formol (p ej., formol acetato sódico, formol al 10 %)
Muestras fecales en fijador basado en alcohol (p. ej., alcohol polivinílico)
Muestras fecales concentradas

- Las muestras deberán mantenerse entre 2 y 8 °C y analizarse en las 24 horas siguientes a su obtención. Las muestras que no puedan analizarse en ese tiempo deberán almacenarse a ≤ -10 °C hasta el momento de su análisis. Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación/descongelación. Si se utilizan muestras congeladas, descongele a temperatura ambiente.
- Asigne e identifique un tubo de ensayo para cada muestra según sea necesario. **Añadir 400 μ l de diluyente a cada tubo.**
- Obtener una pipeta de plástico desechable (suministrada con el kit) para cada muestra.

Pipeta:



- Mezclar todas las muestras y cultivos cuidadosamente independientemente de su consistencia - es imprescindible que las muestras estén suspendidas homogéneamente antes de tomar las muestras de análisis.** Usando la pipeta de plástico desechable, añadir 100 μ l (segunda marca de graduación) de la muestra fecal al tubo que contiene *diluyente* y mezclar bien. Si la muestra no puede pipetearse, utilizar una varilla aplicadora para transferir aproximadamente 0,1 g de heces. Es decir, como el tamaño de un guisante (unos 4 mm de diámetro).
- Cierre cada tubo de muestra diluida y mézclelo bien. Mezcle adecuadamente con vórtex o invirtiendo el tubo varias veces.
- Si se utiliza un equipo de lavado semiautomático o automático, después de la dilución, se deben centrifugar las muestras (5000 x g durante 10 minutos) para eliminar las partículas del sobrenadante antes de la transferencia a los pocillos de ensayo.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

- Espere hasta que todos los reactivos y el número tiras de ensayo que sean necesarios se encuentren a temperatura ambiente antes de su uso.
- Preparar los controles**
 - Controles positivos – agitar cada frasco de *Control Positivo* durante varios segundos y luego añadir una gota a cada pocillo de control positivo.
 - Controles negativos – añadir 100 μ l de *diluyente* a un pocillo adicional para servir como control negativo.
- Utilizando una nueva pipeta para cada muestra, transferir 100 μ l de muestra diluida al pocillo de ensayo de la Placa de microensayo.**
- Recortar la hoja adhesiva de plástico al tamaño necesario para cubrir los pocillos. **Cubrir los pocillos e incubarlos durante 1 hora a temperatura ambiente.**
- Vaciar el contenido de los pocillos de ensayo en un contenedor de desechos.

6. **Lavar bien cada pocillo con la solución de lavado 1 X en un frasco con rociador con boquilla de punta fina**, dirigiendo con fuerza la *solución de lavado* hacia el fondo del pocillo. Llenar los pocillos y a continuación transferir la *Solución de lavado* de los pocillos a un contenedor de desechos. Golpear la placa invertida sobre una toalla de papel seca. Nota: Si se utiliza un equipo de lavado semiautomático o automático, añadir 350 µl de Solución de lavado 1X a cada pocillo. Lavar un total de 5 veces
7. Repetir la etapa 6 cuatro veces más utilizando cada vez una toalla de papel seca. Si se observan partículas en los pocillos, seguir lavando hasta que se elimine esta materia.
8. Después del lavado, retire completamente cualquier líquido residual de los pocillos golpeando la placa sobre una toalla de papel seca hasta que no salga más líquido. Eliminar adecuadamente las toallas de papel y los contenedores de muestras.
9. **Añadir 1 gota (50 µl) de Conjugado (tapa roja) a cada pocillo.**
10. Sellar con una hoja adhesiva de plástico y golpear suavemente para mezclar. **Incubar los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente.**
11. Después de incubar, **repetir el procedimiento de lavado descrito en los pasos 5-8**
12. **Añadir 2 gotas (100 µl) de Sustrato (tapa azul) a cada pocillo.** Golpear suavemente los pocillos para mezclar el sustrato. Incubar los pocillos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Golpear suavemente los pocillos a los 5 minutos.
13. **Añadir 1 gota (50 µl) de Solución de parada (tapa amarilla) a cada pocillo.** Golpear suavemente los pocillos y esperar 2 minutos antes de la lectura. La adición de la *solución de parada* convierte el color azul en amarillo, lo que puede cuantificarse determinando la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA. El instrumento debe calibrarse con aire. Si se utiliza un lector de longitud de onda doble, calibrar con aire a 620 nm y leer a 450 nm. Antes de determinar la densidad óptica, limpiar la parte inferior de cada pocillo. Si no se dispone de un lector de placas de ELISA, la prueba se puede leer visualmente en condiciones de iluminación adecuadas frente a un fondo blanco. Leer a los 10 minutos de añadir la *solución de parada*.

CONTROL DE CALIDAD

1. Se efectuarán un control positivo y un control negativo con cada serie de muestras problema. El control positivo demuestra que la prueba funciona adecuadamente para la detección de antígenos de cada parásito en muestras fecales. El control negativo demuestra que la prueba no está reaccionando inespecíficamente.
2. Los controles positivo y negativo deben estar dentro de sus rangos respectivos o los resultados de la prueba no serán válidos.
 - a) **El control positivo debe tener un color amarillo visible.** Si se lee en un espectrofotómetro, la OD a 450 nm o a 450/620 nm (cuando se utiliza longitud de onda doble) debe ser $\geq 0,500$. Todo pocillo que dé una lectura positiva sin color visible deberá ser colocado de nuevo, se deberá limpiar su parte inferior y se leerá nuevamente.
 - b) **El control negativo debe ser transparente.** Si se lee en un espectrofotómetro, la OD a 450 nm debe ser $< 0,200$. Si se lee a 450/620 nm, la absorbancia debe ser $< 0,160$. En caso contrario, la prueba no es válida y deberá repetirse, prestando atención al procedimiento de lavado.
3. Las lecturas visuales se deben realizar en condiciones adecuadas de iluminación frente a un fondo blanco.
4. Los resultados de la prueba no son válidos a menos que se cumplan las características de rendimiento de los controles positivo y negativo. Si estos resultados no se cumplen, llame al Servicio Técnico.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Lectura espectrofotométrica		
	Longitud de onda única a 450 nm	Longitud de onda doble a 450/620 nm
Negativo	OD < 0,200	OD < 0,160
Positivo	OD ≥ 0,200	OD ≥ 0,160

Interpretación visual

El pocillo de control negativo debe ser incoloro o tener un ligero color amarillo. El pocillo de control positivo debe tener un color amarillo evidente. Si estos resultados no se cumplen, llame al Servicio Técnico. Una muestra se considera positiva si tiene un color amarillo evidente en comparación con el pocillo de control negativo. Puede ser más o menos amarillo que el color observado en el pocillo de control positivo. Una muestra se considera negativa si la reacción es incolora o menos amarilla que el pocillo de control negativo.

Un resultado positivo indica que la presencia de antígeno de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium* y/o *E. histolytica* en la muestra. Un resultado negativo indica la ausencia de antígenos de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium* y/o *E. histolytica* o que el nivel está por debajo del límite de detección del ensayo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* detecta la presencia de antígenos de *Giardia*, *Cryptosporidium* y/o *E. histolytica* en muestras fecales. Los resultados de la prueba deben tenerse en cuenta, por parte del médico, junto con la historia clínica y la exploración física del paciente.
2. El ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* está destinado a la detección cualitativa de antígenos de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium* y/o *E. histolytica* en muestras fecales no conservadas. La intensidad del color no debe interpretarse cuantitativamente.
3. No deben utilizarse muestras fecales concentradas en el ensayo y podrían no dar resultados exactos.

VALORES ESPERADOS

Las personas sanas no deberían estar infectadas por *Giardia*, *Cryptosporidium* o *E. histolytica* y deberían dar un resultado negativo en el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Un resultado positivo en el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* indica que la persona está expulsando cantidades detectables de antígeno de *Giardia*, *Cryptosporidium* y/o *E. histolytica*. La incidencia de infección por *Giardia*, *Cryptosporidium* y *E. histolytica* varía significativamente entre las poblaciones y regiones geográficas. Los niños que van a guarderías tienen mayores tasas de infección por *Giardia* que la población general (11). Asimismo, los varones homosexuales presentan tasas de infección más elevadas (9,12). En general, la incidencia de criptosporidiasis confirmada por laboratorio en países desarrollados oscila entre el 1 % y el 2 % y es superior en niños. Se estima que *Entamoeba histolytica* infecta a uno 50 millones de personas en todo el mundo (9). Casi el 90 % de estas personas no presenta síntomas, mientras que aproximadamente el 10 % desarrolla síntomas clínicos que abarcan desde trastornos gastrointestinales hasta abscesos hepáticos. En los grupos de alto riesgo se incluye a personas que han viajado al extranjero, inmigrantes, personas con inmunodeficiencias, trabajadores extranjeros y varones homosexuales activos (9,14). Las cepas no patógenas (*E. dispar*) son las predominantes entre los hombres homosexuales (15). Con frecuencia la enfermedad se transmite a través de portadores asintomáticos de *E. histolytica*.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se comparó el rendimiento del ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* con un panel de dispositivos específicos para la detección de parásitos únicos (para la detección de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium* y *E. histolytica*) e incluyó 275 muestras frescas y 645 congeladas. La tabla siguiente muestra un resumen del rendimiento clínico del ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* frente al panel de pruebas específicas. Los resultados demuestran que el ensayo mostró una concordancia positiva del 97,8 %, una concordancia negativa del 97,5 % y una concordancia porcentual global del 97,6 %.

<i>n</i> = 920	Panel específico Positivo	Panel específico Negativo
<i>TRI-COMBO</i> Positivo	307	15
<i>TRI-COMBO</i> Negativo	7	591

		Límites de confianza del 95 %
Concordancia positiva	97,8%	95,3 – 99,0%
Concordancia negativa	97,5%	95,9 – 98,6%
Concordancia global	97,6%	97,3 – 97,8%

REPRODUCIBILIDAD

Se determinó la reproducibilidad del ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* usando 20 muestras fecales humanas codificadas para impedir su identificación durante las pruebas. Las pruebas se realizaron en 2 laboratorios independientes e in situ en TECHLAB®, Inc. Las muestras se estudiaron dos veces al día durante un período de 5 días por parte de diversos técnicos en cada centro, usando 2 lotes diferentes del kit. Se realizaron controles positivos y negativos con cada panel de las muestras enmascaradas. Los resultados de cada laboratorio se remitieron posteriormente a TECHLAB®, Inc. y se compararon con resultados internos. Los resultados fueron coherentes entre los diferentes laboratorios y mostraron una correlación del 100 %. Las muestras produjeron los resultados esperados en todos los casos.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se evaluó la reactividad cruzada de la prueba *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* con las cepas bacterianas y víricas enumeradas a continuación. Ninguna de las cepas mostró interferencia con el rendimiento de la prueba *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i> ETEC
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Salmonella enterica typhimurium</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Cowans
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> EIEC	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Adenovirus tipos 1, 2, 3, 5, 40 y 41	Echovirus tipos 9, 11, 18, 22 y 33
Coronavirus, Humano	Enterovirus, tipos 68, 70 y 71
Coxsackievirus, tipos B2, B3, B4 y B5	Rotavirus, Humano

SUSTANCIAS INTERFERENTES (formulaciones de EE.UU.)

Las siguientes sustancias no tuvieron ningún efecto en los resultados positivos o negativos de la prueba analizados a las concentraciones indicadas: mucina gástrica de cerdo (3,5 % p/v), sangre humana (40 % v/v), sulfato de bario (5 % p/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), Mylanta (5 %,v/v), ácido estérico/ácido palmítico (40 % p/v), metronidazol (0,25 % p/v) y vancomicina (0,25 % p/v).

PRECISIÓN – INTRAANALÍTICA

Para la determinación del rendimiento intraanalítico, se analizaron 6 muestras fecales positivas y 5 negativas. Se estudió cada muestra en ocho replicaciones. Todos los resultados positivos siguieron siendo positivos y todos los resultados negativos siguieron siendo negativos.

PRECISIÓN – INTERANALÍTICA

Se determinó la precisión interanalítica del ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* usando 20 muestras fecales (8 negativas, 4 positivas para *Giardia*, 4 positivas para *Cryptosporidium* y 4 positivas para *E. histolytica*). Las muestras se estudiaron dos veces al día durante un período de 5 días usando 2 lotes de kits diferentes. Se estudió un control positivo y negativo cada día. Todas respuestas positivas seguían siendo positivas y todas las muestras negativas seguían siendo negativas.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Se determinó la sensibilidad analítica del ensayo utilizando curvas de dilución de quistes o trofozoítos purificados en una matriz de muestra. Se utilizó la concentración de quistes de *Giardia*, ovoquistes de *Cryptosporidium* y trofozoítos de *E. histolytica* (Pathogenic Zymodeme Amoeba [PZ]) en las que las muestras fueron positivas en el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* el 95 % de las veces para describir el límite de detección (LD) del ensayo. Los resultados del ensayo determinaron que el LD de la valoración es de 8.000 quistes/ml para *Giardia* (equivalente a 160 quistes por ensayo), 40.000 ovoquistes/ml para *Cryptosporidium* (equivalente a 800 ovoquistes detectados por ensayo) y 3,300 PZ/ml para *E. histolytica* (equivalentes a 66 PZ detectados por ensayo). Como el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* detecta antígeno soluble en muestras fecales, además de quistes, ovoquistes y trofozoítos, este estudio de LD representa una estimación de la sensibilidad analítica basada en quistes, ovoquistes o trofozoítos purificados.

FOR INFORMATIONAL USE ONLY

TRI-COMBO PARASITE SCREEN – DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* ist ein Enzymimmunoassay für den gleichzeitigen qualitativen Nachweis von *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.- und/oder *E. histolytica*-Antigenen in menschlichen Stuhlproben. Er dient als Screeningtest für Stuhlproben von Patienten mit Magen-Darm-Erkrankungen einschließlich Ruhr, um bei der Diagnose enteraler Infektionen infolge von Giardiasis, Cryptosporidiosis und Amöbiasis behilflich zu sein. Mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* lassen sich negative Proben ausschließen und lässt sich die Anzahl der Proben, für die weitere Tests erforderlich sind, auf ein Minimum reduzieren.

ERKLÄRUNG

Giardia ist ein zweikerniger begeißelter protozoischer Parasit, der in zwei Formen vorkommt: als nicht-infektiöser, birnenförmiger Trophozoit (9 bis 21 µm), der im Dünndarm lebt, sowie als hochinfektiöse Zyste, die eine elliptische Form und eine Größe zwischen 8 und 12 µm aufweist (in 1 untersucht). Die beiden Formen unterscheiden sich stark in ihrer Überlebensfähigkeit außerhalb des Wirtes: Der Trophozoit ist äußerst labil und überlebt nur wenige Stunden außerhalb des Körpers, während die Zyste mehrere Tage in einer externen Umgebung überleben kann (1). *Giardia* ist oft für Infektionen durch kontaminiertes Wasser verantwortlich. Es wurde die Einschleppung von Giardiasis aus endemischen Gebieten durch Reisende beobachtet. Die Übertragung geschieht auch durch direkten Kontakt, besonders mit asymptomatischen Trägern und durch kontaminierte Nahrungsmittel. Giardiasis ist auch eine weit verbreitete Geschlechtskrankheit (2). Die Kontamination mit tierischen Fäkalien, insbesondere von Wasser, stellt einen weiteren Übertragungsweg beim Menschen dar (1).

Die klinischen Manifestationen der Giardiasis reichen von der asymptomatischen Trägerschaft mit der Weitergabe von Zysten bis zu chronischem schwächendem Durchfall, Gewichtsverlust und Malabsorption. Hochrisikogruppen sind Kleinkinder, immungeschwächte Patienten sowie Personen ohne vorherigen Kontakt mit dem Erreger (1).

Cryptosporidium spp. ist ein protozoischer Parasit von Vertebraten, von dem man ursprünglich annahm, dass er nur bei Tieren Diarrhoe auslöst (3). Im Jahr 1976 wurde die erste menschliche Infektion gemeldet (4). Seitdem hat man festgestellt, dass *Cryptosporidium* spp. in den meisten Teilen der Welt mit Durchfallerkrankungen assoziiert ist und eine häufige Ursache der Reisediarrhoe darstellt. Die Erkrankung wird durch die dickwandige Oozystenform übertragen, die einen Durchmesser von 2-6 µm aufweist und erstaunlich resistent gegen übliche Desinfektionsmittel und routinemäßige Chlorierung des Trinkwassers ist. Die Übertragung von Mensch zu Mensch, besonders bei Kindern, ist weit verbreitet. *Cryptosporidium* weist eine geringe bzw. gar keine Wirtsspezifität auf, und Tiere wie Nager, Rinder und Haustiere fungieren als Träger für die zoonotische Übertragung auf den Menschen. Die Übertragung geschieht entweder durch direkten Kontakt oder durch Kontamination des Wassers mit Fäkalien. Cryptosporidiosis ist eine schwere, opportunistische Infektion bei Patienten mit erworbenem Immunschwächesyndrom (AIDS) und wird potenziell sexuell übertragen (5,6).

Klinische Manifestationen der Cryptosporidiosis sind choleraartige Diarrhoe, Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Gewichtsverlust. Bei gesunden Personen ist die Infektion in der Regel von kurzer Dauer und selbstlimitierend. Bei AIDS-Patienten und anderen immunsupprimierten Personen kann sich Cryptosporidiosis zu einer langwierigen und aufgrund des übermäßigen Flüssigkeitsverlustes lebensbedrohlichen Erkrankung entwickeln (7). Bei diesen Patienten kann sich die Infektion auch auf die Atem- und Gallenwege ausbreiten (5).

Der Lebenszyklus von *Entamoeba histolytica* verläuft ähnlich wie bei anderen Amöben. Der Organismus tritt entweder als Trophozoit mit einem Durchmesser von 10-60 µm oder als Zyste (12-15 µm) auf.(8). Der Mensch fungiert als wichtigster Träger, entweder über die Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder kontaminiertem Wasser oder durch sexuelle Übertragung. Die Zyste ist sehr stabil. Sobald sie in den Darm gelangt, spaltet sie sich

in Trophozoiten auf, die über ein Galactose- oder N-Acetyl-D-Galactosamin-bindendes Lektin, als Galactose-Adhäsine bezeichnet, an die Darmschleimhaut binden. Sobald sich die Trophozoiten angeheftet haben, setzen sie gewebezzerstörende Enzyme und Proteine frei, die die Schleimhautzellen auflösen. Die Galactose-Adhäsine von *E. histolytica* und *E. dispar* gehen serologisch Kreuzreaktionen ein, enthalten jedoch unterschiedliche Epitope. Das Adhäsine wird antigenetisch konserviert, die Adhäsine von pathogenem *E. histolytica* und nicht-pathogenem *E. dispar* können jedoch anhand von monoklonalen Antikörpern unterschieden werden (in 9 untersucht).

E. histolytica und *E. dispar* sind Darmparasiten, mit denen sich etwa eine halbe Milliarde Menschen weltweit pro Jahr infizieren (10). Man geht davon aus, dass nur Malaria und Bilharziose eine häufigere parasitär bedingte Krankheits- und Todesursache darstellen. In den meisten Fällen handelt es sich um eine Infektion mit *E. dispar*, das nicht als krankheitsregend gilt. Offensichtlich ist die weitaus häufigere Infektion mit *E. dispar* im Vergleich zu *E. histolytica* zumindest teilweise für die geringe Prävalenz der Erkrankung angesichts der hohen Infektionsrate verantwortlich. Dennoch infizieren sich schätzungsweise rund 10 % der halben Milliarde an Infizierten pro Jahr mit *E. histolytica*. Bei den Betroffenen manifestieren sich typische Symptome; Kolitis und Leberabszesse treten auf, die zu einer Sterblichkeitsrate von ca. 40.000 bis 120.000 Personen pro Jahr führen. Es muss unbedingt zwischen den beiden Erregerstämmen unterschieden werden, da *E. histolytica* pathogen ist, während *E. dispar* weder mit Kolitis noch Leberabszess assoziiert wird. Eine ungenaue Diagnose kann zu einer ungerechtfertigten und unnötigen Behandlung mit starken Arzneimitteln mit Nebenwirkungen führen.

Patienten mit pathogenen *E. histolytica* können ein breites Krankheitsspektrum aufweisen. Bei manchen ist der Krankheitsverlauf völlig asymptomatisch. Diese Personen scheiden täglich Millionen von Zysten aus und stellen damit ein Verbreitungspotenzial dar. Bei manchen Patienten kommt es zu leichtem Durchfall, der sich nach und nach zu blutigem Durchfall mit Bauchkrämpfen und schließlich zu einer akuten Kolitis verstärkt. Aufgrund der Gewebeschädigung, die dabei auftreten kann, kommt es möglicherweise zu einem Darmdurchbruch, und die Amöben können sich in andere Körperteile verbreiten. Bei etwa 10 % der Patienten mit einer invasiven Amöbiasis bilden sich Leberabszesse (10).

Die Diagnose mittels O&P-Mikroskopie stellte das gängige Verfahren für den Nachweis von Giardiasis, Cryptosporidiosis und Amöbiasis dar. Die Genauigkeit der Ergebnisse einer mikroskopischen Ova- und Parasitenuntersuchung hängt jedoch weitgehend von der Fertigkeit der Laborkraft sowie dem Vorhandensein intakter Zysten im Stuhl ab, die jedoch nicht in allen Proben vorhanden sind. Zudem ist es kaum möglich, mittels Mikroskopie zwischen den pathogenen und den nicht-pathogenen Stämmen von *Entamoeba* zu unterscheiden. Die Erfolgsrate der mikroskopischen Stuhlprobenuntersuchung liegt zwischen 50 % und 70 %, und zur Diagnosestellung sind in der Regel mehrere Proben erforderlich. Wenn eine Infektion vorhanden ist, jedoch keine Parasiten nachgewiesen werden, kann eine Duodenalsaftprobe entnommen und auf Trophozoiten getestet werden. Diese Methode ist jedoch invasiv und teuer. Der Nachweis der Organismen und Antigene mit einem ELISA stellt eine alternative Diagnosemethode mit hoher Sensitivität und Spezifität dar (9). Das ELISA-Verfahren ist sehr leicht durchzuführen und weist im Vergleich zur mikroskopischen Untersuchung eine höhere Sensitivität auf. Große Probenmengen können rasch und objektiv getestet werden, und das Verfahren ist weniger arbeitsaufwändig als die meisten mikroskopischen Methoden.

TESTPRINZIP

Der *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* basiert auf monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen Zelloberflächenantigene von *Giardia*, *Cryptosporidium* und *E. histolytica*. Die Mikrotiterplatte des Kits enthält immobilisierte monoklonale Antikörper gegen die Antigene, und das *Konjugat* besteht aus polyklonalen Antikörpern gegen die Antigene. Bei dem Test wird ein Aliquot einer verdünnten Stuhlprobe in eine Kavität der Mikrotiterplatte übertragen. Die immobilisierten monoklonalen Antikörper binden an die *Giardia*-, *Cryptosporidium*- und/oder *E. histolytica*-Antigene, falls vorhanden. Wenn das *Konjugat* zugegeben wird, bindet es an den

Komplex aus Antigen und Antikörper. Nicht gebundenes Material wird während der Waschschriffe entfernt. Nach der Zugabe von *Substrat* wird aufgrund der Enzym-Antikörper-Antigen-Komplexe, die sich in Gegenwart von Antigen und Konjugat bilden, eine Färbung nachgewiesen.

PACKUNGSINHALT

[CONJ|ENZ]

Konjugat (7 ml) – Antikörper gegen Antigene von *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. und *E. histolytica* in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal
Verdünnungspuffer (50 ml) – Gepufferte Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal. Der *Verdünnungspuffer* wird auch als negative Kontrolllösung verwendet (siehe TESTVERFAHREN)

[H₂SO₄|0.6N]

Stopplösung (7 ml) – 0,6 N Schwefelsäure. VORSICHT: Kontakt mit der Haut vermeiden; im Falle eines Hautkontakts sofort mit Wasser abspülen

[CONTROL|+]

Giardia-Positivkontrolle (3,5 ml) – *Giardia*-Antigen in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal

[CONTROL|+]

Cryptosporidium-Positivkontrolle (3,5 ml) – *Cryptosporidium*-Antigen in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal

[CONTROL|+]

E. histolytica-Positivkontrolle (3,5 ml) – *E. histolytica*-Antigen in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal

[SUBS|REAG]

Substrat (14 ml) - Lösung aus Tetramethylbenzidin und Peroxid

[WASHBUF|20X]

Waschpufferkonzentrat (50 ml) – 20x-Konzentrat mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, Detergens und 0,2 % Thimerosal

[MA|PLT]

Mikrotiterplatte – 12 Streifen, 8 Kavitäten pro Streifen, beschichtet mit Antikörpern gegen *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. - und *E. histolytica*-Antigen (mit Trockenmittel gelagert)

[IVD]

Medizinprodukt für die *In-Vitro*-Diagnostik

ZUBEHÖR

100 Einweg-Transferpipetten aus Kunststoff 2 Kunststoffklebefolien 1 Waschlösungsetikett

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT ENTHALTEN)

Spritzflasche für das Waschreagens

Vortex-Schüttler

950 ml destilliertes Wasser zur Verdünnung des Waschreagens

Abfallbehälter

Saugpapier

ELISA-Lesegerät für eine Wellenlänge von 450 nm oder 450/620 nm

Applikatorstäbchen

Reagenzröhrchen zur Stuhlprobenverdünnung (z.B. Mikrozentrifugenröhrchen)

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum dieses Testkits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Das Verfallsdatum für die einzelnen Bestandteile ist auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Das Kit muss zwischen 2 °C und 8 °C gelagert und nach dem Gebrauch so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank gegeben werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Alle Bestandteile des Kits müssen auf Anzeichen von Undichtigkeit untersucht werden. Bei Erhalt des Kits ist sicherzustellen, dass die Komponenten nicht aufgrund unsachgemäßer Transportbedingungen gefroren oder zu warm sind.
2. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen. Verwenden Sie das Testkit nicht nach dem angegebenen Verfallsdatum.
3. Lassen Sie alle Bestandteile VOR DER VERWENDUNG RAUMTEMPERATUR annehmen!
4. Reagenzien nicht einfrieren. Das Kit muss bei einer Temperatur zwischen 2° C und 8° C gelagert werden.
5. Verschlüsse und Spitzen sind farbkodiert; NICHT vertauschen!

6. Achten Sie bei der Handhabung der Kavitäten darauf, diese nicht zu verkratzen, da dies zu erhöhten Absorptionsmesswerten führen kann.
7. Ungebrauchte Kavitäten der Mikrotiterplatte müssen mit Trockenmittel zurück in den wiederverschließbaren Beutel gegeben werden, damit sie vor Feuchtigkeit geschützt sind. Überprüfen Sie die Trockenmittelpackung vor dem Gebrauch der Kavitäten. Der Farbindikator auf der Trockenmittelpackung muss blau sein. Ein rosafarbener Indikator bedeutet, dass die Qualität der Kavitäten nicht gewährleistet ist. Verwenden Sie bitte keine Kavitäten bei rosafarbenem Trockenmittel.
8. Halten Sie die Reagenzflaschen bei der Reagenzienaussgabe senkrecht, um eine angemessene Tropfengröße und korrekte Menge sicherzustellen.
9. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Kavitäten als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Schutzhandschuhe.
10. Die Reagenzien enthalten 0,02 % Thimerosal als Konservierungsstoff und sind gemäß üblicher Laborpraxis mit Vorsicht zu behandeln.
11. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien kann die Genauigkeit des Tests beeinträchtigen. Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien, indem Sie sterile Einweg-Pipetten für die Reagenzienentnahme aus den Flaschen verwenden.
12. Mit Ausnahme des *Waschpufferkonzentrats* werden alle Reagenzien in gebrauchsfertigen Flaschen geliefert. Die Reagenzien können direkt aus den Tropfflaschen verteilt oder für Mehrkanalpipetten dekantiert werden. Wenn überschüssiges Reagens dekantiert wird, muss der Überschuss entsorgt werden. Nicht zurück in die Flasche gießen. Das *Substrat* muss in der lichtgeschützten Flasche, in der es geliefert wurde, gelagert und direkt aus dieser verwendet werden. Wenn aus der Originalflasche aus irgendeinem Grund ein Aliquot entnommen wurde, darf nicht verwendetes *Substrat* nicht wieder zurück in die Originalflasche gegeben werden.
13. Führen Sie das Waschverfahren nach Anweisung durch, um starke Hintergrundreaktionen zu vermeiden.
14. Die *Stopplösung* enthält 0,6 N Schwefelsäure. Bei Kontakt mit Haut oder Augen sofort mit Wasser abspülen.
15. Das *Substrat* ist lichtempfindlich und muss vor direktem Sonnenlicht und UV-Quellen geschützt werden.
16. Der Test wurde in Bezug auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Halten Sie sich genau an die Anweisungen. Abweichungen vom angegebenen Verfahren und/oder Änderungen der Testbedingungen können die Sensitivität und Spezifität des Tests beeinflussen.
17. Stuhlproben können potenzielle Infektionserreger enthalten und sind wie im CDC NIH-Handbuch „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Labors) empfohlen nach „Biosicherheitsstufe 2“ zu handhaben.

VORBEREITUNGEN

1. **Vor der Verwendung müssen alle Reagenzien Raumtemperatur angenommen haben.**
2. **Bereiten Sie 1xWaschlösung zu.** Das *Waschpuffer-Konzentrat* wird als 20x-Konzentrat geliefert (möglicherweise ist ein Präzipitat sichtbar). Verdünnen Sie es auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter, indem Sie 50 ml Konzentrat 950 ml destilliertem Wasser hinzufügen. Die 1x-*Waschlösung* kann zwischen 2° C und 8° C gelagert werden.
3. **Vorbereitung der Teststreifen.** Jeder Streifen enthält 8 Kavitäten, die mit Antikörpern gegen *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.- und *E. histolytica* -Antigen beschichtet sind. Für jede Probe bzw. Kontrolle ist eine dieser beschichteten Kavitäten erforderlich. Legen Sie die Anzahl der zu verwendenden Kavitäten fest. Vermeiden Sie eine Berührung des Bodens der Kavitäten. Nicht verwendete Mikrotiterplattenkavitäten müssen zurück in den Folienbeutel gegeben und mit Trockenmittel gut verschlossen werden.

HANDHABUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

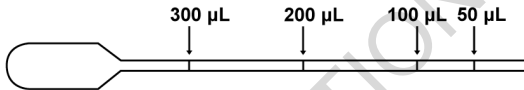
Die üblichen Methoden zur Entnahme und Handhabung von Stuhlproben sind geeignet. Die Entnahmemethoden für die zur Untersuchung von Eiern und Parasiten üblichen Mikroskopieverfahren können unverändert übernommen werden.

Akzeptable Probentypen
Frishe Stuhlproben
Gefrorene Stuhlproben (gefrorene unverdünnte Proben)

Nicht verwenden
Stuhlproben in Fixiermittel auf Formalinbasis (z.B. Natriumacetat-Formalin, Formalin 10 %)
Stuhlproben in Fixiermittel auf Alkoholbasis (z.B. Polyvinylalkohol)
Konzentrierte Stuhlproben

1. Nicht konservierte Proben müssen zwischen 2 °C und 8 °C gelagert und innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme getestet werden. Proben, die nicht innerhalb dieser Zeit getestet werden können, müssen bis zum Test bei mindestens -10 °C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren/Auftauen ist zu vermeiden. Gefrorene Proben bei Raumtemperatur auftauen.
2. Verwenden Sie für jede Stuhlprobe ein eigenes Reagenzglas, und kennzeichnen Sie es. **Geben Sie 400 µl Verdünnungspuffer in jedes Reagenzglas.**
3. Sie benötigen 1 Einweg-Kunststofftransferpipette (im Lieferumfang enthalten) für jede Probe.

Transferpipette



4. **Mischen Sie alle Proben unabhängig von ihrer Konsistenz gründlich durch – eine gleichmäßige Suspension der Proben vor dem Übertragen ist unbedingt erforderlich.** Geben Sie mithilfe der Einweg-Kunststofftransferpipette 100µl (2. Markierung) Stuhlprobe in das Reagenzglas mit dem *Verdünnungspuffer*, und mischen Sie gut. Wenn die Probe nicht pipettiert werden kann, übertragen Sie etwa 0,1 g Stuhl mit einem Applikatorstäbchen. Dies entspricht etwa der Größe einer kleinen Erbse (Durchmesser ca. 4 mm).
5. Verschließen Sie alle Reagenzgläser mit den verdünnten Proben, und mischen Sie gründlich. Gründliches Mischen erzielen Sie durch Vortexen oder mehrmaliges Umdrehen des Reagenzglases.
6. Bei Verwendung automatischer oder halbautomatischer Waschgeräte müssen die Proben zur Entfernung von Partikeln aus dem Überstand vor dem Übertragen in die Kavitäten zentriert werden (5000 x g – 10 Minuten).

TESTVERFAHREN

1. Lassen Sie alle Reagenzien und die erforderliche Anzahl von Teststreifen vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen.
2. **Zubereitung der Kontrollen**
 - a. Positive Kontrollen – Schütteln Sie jede Flasche mit *positiver Kontrolle* einige Sekunden lang und fügen Sie dann jeder Kavität für die positive Kontrolle einen Tropfen hinzu.
 - b. Negative Kontrollen – Geben Sie 100 µl *Verdünnungspuffer* in eine weitere Kavität, die als negative Kontrolle dient.
3. **Übertragen Sie 100 µl verdünnte Probe mit einer neuen Transferpipette für jede Probe in die Testkavität der Mikrotiterplatte.**
4. Schneiden Sie den Kunststoffklebebogen so zurecht, dass er die Kavitäten abdeckt. **Decken Sie die Kavitäten ab, und inkubieren Sie sie 1 Stunde lang bei Raumtemperatur.**
5. Schütteln Sie den Inhalt der Testkavitäten in eine Abfallschale aus.

6. **Waschen Sie jede Kavität mit der 1xWaschlösung aus einer Spritzflasche mit feiner Düse**, indem Sie die *Waschlösung* jeweils kraftvoll auf den Boden der Kavität richten. Füllen Sie die Kavitäten, und schütteln Sie die *Waschlösung* aus der Kavität in eine Abfallschale aus. Schlagen Sie die umgedrehte Platte gegen ein trockenes Papiertuch.
Hinweis: Bei Verwendung eines halbautomatischen bzw. automatischen Waschgeräts geben Sie 350 µl 1xWaschlösung in jede Kavität. Insgesamt 5 Mal waschen.
7. Wiederholen Sie Schritt 6 vier Mal, und verwenden Sie dabei jedes Mal ein trockenes Papiertuch. Wenn in den Kavitäten Partikel sichtbar sind, fahren Sie mit dem Waschen fort, bis alle Partikel beseitigt sind.
8. Entfernen Sie nach dem Waschen sämtliche Flüssigkeitsreste aus den Kavitäten, indem Sie die Platte gegen ein trockenes Papiertuch ausschlagen, bis keine Flüssigkeit mehr austritt. Entsorgen Sie die Papiertücher und Probenbehältnisse ordnungsgemäß.
9. **Geben Sie 1 Tropfen (50 µl) Konjugat (roter Verschluss) in jede Kavität.**
10. Verschließen Sie die Platte mit einem Kunststoffklebebogen, und klopfen Sie zum Mischen sanft dagegen. **Inkubieren Sie die Kavitäten 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur.**
11. Nach dem Inkubieren **wiederholen Sie die unter 5-8 beschriebenen Waschschr**itte.
12. **Geben Sie 2 Tropfen (100 µl) Substrat (blauer Verschluss) in jede Kavität.** Klopfen Sie zum Mischen des Substrats sanft gegen die Kavitäten. Inkubieren Sie die Kavitäten 10 Minuten lang bei Zimmertemperatur. Klopfen Sie nach 5 Minuten sanft gegen die Kavitäten.
13. **Geben Sie 1 Tropfen (50 µl) Stopplösung (gelber Verschluss) in jede Kavität.** Klopfen Sie sanft gegen die Kavitäten, und warten Sie 2 Minuten bis zum Ablesen. Durch Zugabe der *Stopplösung* wandelt sich die blaue Färbung in eine gelbe Färbung um. Dieser Effekt kann quantifiziert werden, indem die optische Dichte bei 450 nm mit einem ELISA-Lesegerät gemessen wird. Für das Instrument muss der Leerwert gegen Luft ermittelt werden. Wenn Sie ein Lesegerät für zwei Wellenlängen benutzen, messen Sie den Leerwert bei 620 nm und lesen bei 450 nm ab. Wischen Sie vor der Messung der optischen Dichte die Unterseite jeder Kavität ab. Sollte kein ELISA-Lesegerät verfügbar sein, so kann das Testergebnis bei guten Lichtverhältnissen gegen einen weißen Hintergrund visuell abgelesen werden. Lesen Sie innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der *Stopplösung* ab.

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Bei jeder Testprobenserie müssen eine positive und eine negative Kontrolle mitgetestet werden. Die positive Kontrolle zeigt, dass der Test ordnungsgemäß für den Nachweis des jeweiligen Parasiten-Antigens in menschlichen Stuhlproben funktioniert. Die negative Kontrolle zeigt, dass der Test nicht unspezifisch reagiert.
2. Die positiven und negativen Kontrollen müssen in ihrem jeweiligen Bereich liegen, andernfalls sind die Testergebnisse ungültig.
 - a) **Die positive Kontrolle muss eine sichtbare gelbe Färbung aufweisen.** Wenn mit einem Spektrophotometer abgelesen wird, muss die optische Dichte bei 450 bzw. 450/620 $\geq 0,500$ betragen. Kavitäten, die einen positiven Messwert, jedoch keine sichtbare Färbung ergeben, müssen neu positioniert, an der Unterseite abgewischt und nochmals abgelesen werden.
 - b) **Die negative Kontrolle muss optisch farblos sein.** Wenn mit einem Spektrophotometer abgelesen wird, muss die optische Dichte bei 450 $< 0,200$ betragen. Wenn bei 450/620 abgelesen wird, muss die Absorption $< 0,160$ sein. Andernfalls ist der Test ungültig und muss unter besonderer Beachtung des Waschverfahrens wiederholt werden.
3. Visuelles Ablesen muss bei guten Lichtverhältnissen gegen einen weißen Hintergrund durchgeführt werden.
4. Die Testergebnisse sind nur dann gültig, wenn die Leistungsdaten der positiven und negativen Kontrollen erfüllt sind. Wenden Sie sich an den technischen Kundendienst, wenn Sie diese Ergebnisse nicht erzielen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

	Spektrophotometrische Messwerte	
	Bei einer Wellenlänge 450 nm	Bei zwei Wellenlängen von 450/620 nm
Negativ	OD < 0,200	OD < 0,160
Positiv	OD ≥ 0,200	OD ≥ 0,160

Visuelle Interpretation

Die negativen Kontrollen sollten keine oder nur eine schwache Gelbfärbung aufweisen. Die Kavität der positiven Kontrolle muss eine sichtbare gelbe Färbung aufweisen. Wenden Sie sich an den technischen Kundendienst, wenn Sie diese Ergebnisse nicht erzielen. Eine Testprobe gilt als positiv, wenn sie eine sichtbare gelbe Färbung im Vergleich zur Kavität der negativen Kontrolle aufweist. Sie kann eine schwächere oder eine intensivere gelbe Färbung als jene in der Kavität der positiven Kontrolle haben. Eine Testprobe gilt als negativ, wenn die Reaktion keine Färbung oder eine geringere Gelbfärbung als die negative Kontrolle aufweist.

Ein positives Testergebnis weist darauf hin, dass *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.- und/oder *E. histolytica*-Antigen in der Probe vorhanden ist. Ein negatives Testergebnis weist darauf hin, dass kein *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.- und/oder *E. histolytica*-Antigen in der Probe vorhanden ist oder die Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests liegt.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Der *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* weist *Giardia*-, *Cryptosporidium*- und/oder *E. histolytica*-Antigen in Stuhlproben nach. Die Testergebnisse müssen vom Arzt unter Berücksichtigung der Patientenanamnese und einer körperlichen Untersuchung des Patienten ausgewertet werden.
2. Der *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* ist für den qualitativen Nachweis von *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.- und/oder *E. histolytica*-Antigen in nicht konservierten Stuhlproben vorgesehen. Die Farbintensität darf nicht quantitativ interpretiert werden.
3. Konzentrierte Stuhlproben dürfen nicht getestet werden; sie liefern keine genauen Ergebnisse.

ERWARTUNGSWERTE

Normale, gesunde Personen sollten nicht mit *Giardia*, *Cryptosporidium* oder *E. histolytica* infiziert sein und beim *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* ein negatives Ergebnis liefern. Ein positives Ergebnis beim *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* weist darauf hin, dass die Person nachweisbare Konzentrationen von *Giardia*-, *Cryptosporidium*- und/oder *E. histolytica* -Antigen ausschüttet. Die Häufigkeit von *Giardia*-, *Cryptosporidium*- und *E. histolytica*-Infektionen variiert beträchtlich je nach Population und geografischer Region. Bei Kindern in Tagesstätten wurden höhere *Giardia*-Infektionsraten als in der allgemeinen Bevölkerung festgestellt (11). Außerdem wurden bei homosexuellen Männern höhere Infektionsraten beobachtet (9,12). Allgemein liegt die durch Laboruntersuchungen belegte Häufigkeit von Cryptosporidiosis in Industrieländern insgesamt zwischen 1 % und 2 %, mit einer größeren Häufigkeit bei Kindern. Schätzungen gehen davon aus, dass rund 50 Millionen Personen weltweit von *Entamoeba histolytica* betroffen sind (9). Etwa 90 % dieser Personen bleiben asymptomatisch, während bei 10 % klinische Symptome auftreten, die von Magen-Darm-Erkrankungen bis zu Leberabszessen reichen können. Hochrisikogruppen sind Personen, die Auslandsreisen unternommen haben, Immigranten, immungeschwächte Patienten, Gastarbeiter und aktive männliche Homosexuelle (9,14). Nichtpathogene Stämme (*E. dispar*) sind bei männlichen Homosexuellen vorherrschend (15). Die Krankheit wird häufig durch asymptomatische Träger von *E. histolytica* übertragen.

LEISTUNGSDATEN

Die Leistung des *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* wurde mit einer Reihe vergleichbarer Produkte für den Nachweis der einzelnen Parasiten (für den Nachweis von *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. und *E. histolytica*) verglichen. Es wurden 275 frische und 645 gefrorenen Proben getestet. In der folgenden Tabelle sind die klinischen Leistungsdaten des *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* und der vergleichbaren Produkte zusammengefasst. Wie an den Ergebnissen zu sehen ist, wies der Test eine positive Übereinstimmung von 97,8 %, eine negative Übereinstimmung von 97,5 % und eine Gesamtübereinstimmung von 97,6 % auf.

Az. = 920	Vergleocjbare Produkte Positiv	Vergleichbare Produkte Negativ
<i>TRI-COMBO</i> positiv	307	15
<i>TRI-COMBO</i> negativ	7	591

		95%-Konfidenzgrenzen
Positiv Übereinstimmung	97,8%	95,3 – 99,0%
Negative Übereinstimmung	97,5%	95,9 – 98,6%
Gesamtübereinstimmung	97,6%	97,3 – 97,8%

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit des *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* wurde anhand von 20 Stuhlproben bestimmt, die zur Verhinderung einer Identifikation während des Tests kodiert wurden. Die Tests wurden in 2 unabhängigen Labors und intern bei TECHLAB®, Inc durchgeführt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen zweimal täglich von mehreren Laborkräften an den einzelnen Standorten getestet. Es wurden jeweils 2 verschiedene Kitchargen verwendet. Mit jeder maskierten Probenreihe wurden eine positive und eine negative Kontrolle mitgetestet. Die Ergebnisse der einzelnen Labors wurden anschließend an TECHLAB®, Inc. eingesandt und mit internen Ergebnissen verglichen. Die Ergebnisse der verschiedenen Standorte waren durchgehend konsistent und ergaben eine Korrelation von 100 %. Die Proben lieferten zu 100% die erwarteten Ergebnisse.

KREUZREAKTIVITÄT

Der *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* wurde auf Kreuzreaktivität mit den folgenden Bakterien- und Virenstämmen untersucht. Keiner dieser Stämme zeigte eine Kreuzreaktivität mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*.

Aeromonas hydrophila

Bacillus cereus

Bacillus subtilis

Bacteroides fragilis

Campylobacter coli

Campylobacter fetus

Campylobacter jejuni

Candida albicans

Clostridium bifermentans

Clostridium difficile

Enterococcus faecalis

Escherichia coli

Escherichia coli EIEC

Escherichia coli ETEC

Escherichia coli 0157:H7

Klebsiella pneumoniae

Salmonella enterica typhimurium

Shigella dysenteriae

Shigella flexneri

Shigella sonnei

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus Cowans

Staphylococcus epidermis

Vibrio cholerae

Vibrio parahemolyticus

Yersinia enterocolitica

Adenovirus, Typ 1, 2, 3, 5, 40 und 41

Coronavirus, menschlich

Coxsackievirus, Typ B2, B3, B4 und B5

Echovirus, Typ 9, 11, 18, 22 und 33

Enterovirus, Typ 68, 70 und 71

Rotavirus, menschlich

INTERFERIERENDE STOFFE (US-FORMULIERUNGEN)

Die folgenden Stoffe hatten in den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluss auf die positiven oder negativen Testergebnisse: Mucin aus dem Schweinemagen (3,5% w/v), menschliches Blut (40% v/v), Bariumsulfat (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), Mylanta (5% v/v), Stearinsäure/Palmitinsäure (40% w/v), Metronidazol (0,25% w/v), Vancomycin (0,25% w/v).

INTRA-ASSAY-PRÄZISION

Für die Bestimmung der Intra-Assay-Leistung wurden 6 positive Stuhlproben und 5 negative Stuhlproben untersucht. Getestet wurde mit 8 Replikaten je Probe. Alle positiven Proben blieben positiv und alle negativen negativ.

INTER-ASSAY-PRÄZISION

Die Inter-Assay-Präzision des *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* wurde anhand von 20 Stuhlproben (8 negative, 4 *Giardia*-positive, 4 *Cryptosporidium*-positive und 4 *E. histolytica*-positive) bestimmt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen 2x täglich anhand von 2 verschiedenen Kitchargen getestet. Es wurden täglich positive und negative Kontrollen mitgetestet. Alle positiven Proben blieben positiv und alle negativen Proben negativ.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität des Tests wurde anhand von Verdünnungskurven gereinigter Zysten oder Trophozoiten in einer Probenmatrix bestimmt. Die Konzentration an *Giardia*-Zysten, *Cryptosporidium*-Oozysten und *E. histolytica*-Trophozoiten (pathogene Zymodem-Amöbe [PZ]), bei der Proben mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* in 95% der Fälle positiv waren, wurde zur Definition der Nachweisgrenze (NG) des Tests verwendet. Anhand der Testergebnisse ergab sich eine NG von 8.000 Zysten/ml für *Giardia* (entspricht 160 nachgewiesenen Zysten pro Test), 40.000 Oozysten/ml für *Cryptosporidium* (entspricht 800 nachgewiesenen Oozysten pro Test) und 3.300 PZ/ml für *E. histolytica* (entspricht 66 nachgewiesenen PZ pro Test). Da der *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* neben Zysten, Oozysten und Trophozoiten auch lösliches Antigen in Stuhlproben nachweist, ist diese NG-Studie als Schätzung der analytischen Sensitivität auf der Basis von gereinigten Zysten, Oozysten und Trophozoiten zu verstehen.

FOR INFORMATIONAL USE
ONLY

TRI-COMBO PARASITE SCREEN – FRANÇAIS

UTILISATION PRÉVUE

Le test TRI-COMBO PARASITE SCREEN est un test immunoenzymatique pour la détection qualitative simultanée de l'antigène *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. et/ou *E. histolytica* dans les échantillons de selles humaines. Le test convient comme marqueur des prélèvements de selles de patients souffrant de maladies gastro-intestinales, notamment de dysenterie, afin de permettre le diagnostic des infections à entérobactéries entraînant des lamblases, la cryptosporidie et l'amibiase. Le test TRI-COMBO PARASITE SCREEN sert de marqueur pour exclure des échantillons négatifs et réduire le nombre d'échantillons nécessitant un test de suivi supplémentaire.

EXPLICATION

La *Giardia* est un parasite protozoaire flagellé binucléaire existant sous deux formes: un trophozoïte en forme de poire non infectieux (9 à 21 µm) que l'on trouve dans l'intestin grêle et une forme de kyste elliptique hautement infectieuse et dont les dimensions varient de 8 à 12 µm (1). La survie de chacune de ces deux formes dans le milieu extérieur est très variable : extrêmement labile, le trophozoïte ne subsiste que quelques heures en dehors du corps tandis que la forme de kyste peut survivre plusieurs jours dans un environnement externe (1). La *Giardia* est responsable des infections dues à la contamination des eaux ; les voyageurs sont susceptibles de contracter la lamblase dans les régions où cette affection est endémique. La transmission se produit aussi par contact direct, en particulier par le biais de porteurs asymptomatiques et par contamination de la nourriture. La lamblase est considérée comme une maladie sexuellement transmissible courante (2). La contamination par le biais des matières fécales d'origine animale — contamination de l'eau, notamment — est également une voie de transmission aux humains (1).

Les manifestations cliniques de la lamblase s'étendent du porteur asymptomatique qui transmet le kyste, aux diarrhées chroniques débilitantes, à la perte de poids et à la malabsorption. Les catégories à haut risque incluent les enfants en bas âge, les patients immunodéficients et les personnes n'ayant jamais été exposées auparavant (1).

On considérait autrefois que le *Cryptosporidium* — parasite protozoaire des vertébrés — provoquait des diarrhées uniquement chez les animaux (3). La première infection humaine a été signalée en 1976 (4). Depuis, le *Cryptosporidium* a été associé au syndrome diarrhéique dans la plupart des régions du monde, s'avérant fréquemment responsable de la diarrhée du voyageur. La maladie est transmise par l'oocyste à paroi épaisse (2-6 µm de diamètre), remarquablement résistant aux désinfectants courants et à la chloration de l'eau destinée à la consommation. La transmission d'une personne à une autre est courante, en particulier chez les enfants. Le *Cryptosporidium* a peu, voire aucun hôte spécifique ; les animaux tels que les rongeurs, le bétail et les animaux de compagnie sont de simples porteurs responsables de la transmission zoonotique à l'homme, celle-ci se produisant soit par contact direct, soit par contamination fécale des points d'eau. La cryptosporidie est une infection opportuniste grave pour les personnes atteintes du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) ; elle est d'ailleurs recensée parmi les maladies potentiellement transmissibles par voie sexuelle.

Les manifestations cliniques de la cryptosporidie sont les suivantes : diarrhées aiguës (semblables à celles que provoque le choléra), douleurs abdominales, nausées, vomissements et perte de poids. Chez les personnes en bonne santé, l'infection est généralement limitée et de courte durée. Chez les personnes atteintes du SIDA ou de tout autre syndrome immunodéficient, la cryptosporidie peut entraîner une affection prolongée, voire mortelle, suite à une forte perte de liquides (7). Chez ces patients, l'infection peut par ailleurs se propager au système respiratoire et au système biliaire (5).

Le cycle de vie de l'*Entamoeba histolytica* est similaire à celui observé chez d'autres amibes. L'organisme existe en tant que trophozoïte, d'un diamètre égal à 10-60 µm, ou en tant que kyste (12-15 µm) (8). Les êtres humains constituent le réservoir principal car l'organisme se diffuse dans toute la nourriture ingérée et l'eau contaminée ou par contact sexuel. Le kyste est très stable. Une fois dans l'intestin, il commence à se diviser en trophozoïtes qui

se lient aux muqueuses intestinales via une galactose ou à la lectine liée à la galactosamine D acétyle N appelée l'adhésine galactose. Une fois les trophozoïtes liés, ils libèrent des enzymes qui abîment les tissus et protéines qui détruisent les cellules des muqueuses. Les adhésines galactose de l'*E. histolytica* et de l'*E. dispar* provoquent des réactions croisées mais contiennent différents épitopes. L'adhésine est conservée antigéniquement mais des anticorps monoclonaux sont utilisés pour différencier l'adhésine pathogène de l'*E. histolytica* de l'adhésine non-pathogène de l'*E. dispar* (9).

L'*E. histolytica* et l'*E. dispar* sont des parasites intestinaux qui touchent environ 500 millions de personnes dans le monde chaque année (10). Seuls le paludisme et la bilharziose sont considérés comme des causes parasitaires plus prévalentes de morbidité et de mortalité. La plupart des personnes infectées le sont par l'*E. dispar*, lequel n'a pas été associé à la maladie. L'infection à l'*E. dispar* plutôt qu'à l'*E. histolytica* est censée expliquer, au moins en partie, le faible taux d'attaque par rapport au taux d'infection élevé. Malgré cela, on estime qu'environ 10 % des 500 millions de personnes infectées chaque année le sont par l'*E. histolytica*. Ces individus deviennent symptomatiques et développent des colites et des abcès du foie, avec pour conséquence une mortalité estimée entre 40 000 et 120 000 personnes tous les ans. Il convient de distinguer les deux espèces car l'*E. histolytica* est pathogène alors que l'*E. dispar* n'est pas associé aux colites ou à l'abcès du foie. Un diagnostic imprécis peut par ailleurs entraîner un traitement non garanti et inutile avec des médicaments aux effets indésirables.

Les patients infectés par l'*E. histolytica* pathogène peuvent présenter un large éventail de conditions. Certains sont totalement asymptomatiques. Ces personnes diffusent des millions de kystes tous les jours et représentent un réservoir potentiel de dissémination. Certains patients peuvent présenter des diarrhées légères qui deviennent sanglantes et provoquent des crampes abdominales, entraînant finalement des colites fulminantes. À cause des lésions tissulaires qui peuvent se produire, les intestins risquent de se perforer et l'amibe peut s'étendre à d'autres parties du corps. Environ 10 % des personnes atteintes d'amibiase invasive développent un abcès du foie (10).

La méthode la plus utilisée pour détecter la lambliaze, la cryptosporidie et l'amibiase est l'analyse microscopique O&P. La précision des résultats O&P dépend toutefois de la compétence du technicien et repose sur la présence de kystes intacts dans les selles, qui peuvent ne pas être présents dans toutes les selles. Par ailleurs, il est rarement possible de différencier les espèces pathogènes des espèces non pathogènes d'*Entamoeba* par microscopie. Le taux de réussite des analyses de selles par microscopie se situe entre 50 et 70 %, plusieurs échantillons étant généralement nécessaires pour établir un diagnostic. Quand l'infection est présente mais qu'aucun parasite n'est détecté par microscopie, les trophozoïtes peuvent être dépistés par prélèvement et analyse des fluides duodénaux; il s'agit cependant d'une méthode invasive et onéreuse. Sensible et spécifique, la détection de l'organisme et des antigènes par ELISA constitue une méthode diagnostique alternative (9). La procédure ELISA est relativement simple à réaliser et présente une meilleure sensibilité par rapport aux analyses effectuées au microscope. Elle permet d'analyser rapidement et objectivement un grand nombre d'échantillons et requiert beaucoup moins de main-d'œuvre que la plupart des analyses microscopiques.

PRINCIPE DU TEST

Le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* utilise des anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre les antigènes de surface cellulaire de *Giardia*, *Cryptosporidium* et *E. histolytica*. Les microplaques fournies avec le kit sont enduites d'anticorps monoclonaux immobilisés contre les antigènes et le *Conjugué* se compose d'un anticorps polyclonal contre les antigènes. Lors de l'analyse, une quantité aliquote de selles diluées est introduite dans le micropuits. Les anticorps monoclonaux immobilisés se lient aux antigènes de la *Giardia*, du *Cryptosporidium* et/ou de l'*E. histolytica* le cas échéant. Le *Conjugué* est ensuite ajouté et se lie au complexe antigène/anticorps. Tout matériel non lié est éliminé lors du processus de lavage. L'adjonction du *Substrat* entraîne une modification de la coloration suite à la formation d'un complexe enzyme-anticorps-antigène en présence d'antigènes et de conjugué.

MATÉRIEL FOURNI

[CONJ ENZ]	Conjugué (7 ml) – Anticorps contre les antigènes de <i>Giardia</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp. et <i>E. histolytica</i> dans une solution de protéine tamponnée contenant du thimérosal à 0,02 %
[DIL SPE]	Diluant (50 ml) – Solution tamponnée et protéinée contenant du thimérosal à 0,02 %. Le <i>Diluant</i> est également utilisé comme solution de contrôle négatif (voir PROCÉDURE DE TEST)
H₂SO₄ 0.6N	Solution d'arrêt (7 ml) – 0,6 N d'acide sulfurique. ATTENTION : Éviter tout contact avec la peau ; en cas de contact, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau.
[CONTROL+]	Contrôle positif Giardia (3,5 ml) – Antigène <i>Giardia</i> dans une solution tamponnée et protéinée de thimérosal à 0,02 %
[CONTROL+]	Contrôle positif Cryptosporidium (3,5 ml) – Antigène <i>Cryptosporidium</i> dans une solution tamponnée et protéinée de thimérosal à 0,02 %
[CONTROL+]	Contrôle positif d'E. histolytica (3,5 ml) – Antigène <i>E. histolytica</i> dans une solution tamponnée et protéinée avec du thimérosal à 0,02 %
[SUBS REAG]	Substrat (14 ml) – Solution contenant du tétraméthylbenzidine et du peroxyde
[WASHBUF 20X]	Tampon de lavage concentré (50 ml) – Concentré à 20X contenant un tampon salin phosphaté, un détergent et du thimérosal à 0,2 %
[MA PLT]	Microplaque – 12 bandes, 8 micropuits par bande enduits d'anticorps spécifiques aux antigènes <i>Giardia</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp. et <i>E. histolytica</i> (sous emballage contenant un agent de dessiccation)
[IVD]	Dispositif médical <i>in vitro</i>

ACCESSOIRES

100 pipettes de transfert en plastique jetables
1 Étiquette de la solution de lavage

2 Films adhésifs en plastique

MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Pulvérisateur pour le réactif de lavage

Agitateur vortex

950 ml d'eau distillée pour diluer le réactif de lavage

Réceptacle à déchets

Papier absorbant

Lecteur ELISA capable d'effectuer une lecture à 450 nm ou à 450/620 nm

Petits tubes pour la dilution d'échantillons de selles (par exemple des tubes microcentrifuges)

Écouvillons

DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption du kit est indiquée sur l'emballage. La date d'expiration de chaque composant est indiquée sur chaque étiquette. Le kit doit être stocké à une température comprise entre 2 et 8 °C et remis au réfrigérateur dès que possible après utilisation.

PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Contrôler tous les éléments du kit afin de vérifier l'absence de fuites. Examiner le kit dès sa réception afin de vérifier que les éléments ne sont ni congelés ni chauds au toucher en raison de conditions de transports inadéquates.
2. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés. Ne pas utiliser le kit si sa date de péremption est dépassée.
3. Placer tous les composants à TEMPÉRATURE AMBIANTE AVANT UTILISATION !
4. Ne pas congeler les réactifs. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.
5. Les capsules et les embouts sont classés par couleur. Il convient de NE PAS les mélanger ni les échanger !
6. Lors des manipulations, éviter d'érafler le fond des micropuits, toute dégradation pouvant entraîner un relevé d'absorbance élevée.

7. Les micropuits non utilisés doivent être placés dans l'emballage refermable contenant un agent de dessiccation pour les protéger de l'humidité. Vérifier le paquet de déshydratant avant d'utiliser les micropuits. L'indicateur coloré du paquet de déshydratant doit être bleu. Si la couleur devient rose, la qualité des micropuits peut être compromise. Ne pas utiliser les micropuits conservés avec un déshydratant rose.
8. Verser les réactifs en tenant les flacons à la verticale de façon à instiller une goutte de taille adéquate et des volumes corrects.
9. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme tout facteur potentiel de transmission d'agents infectieux. Utiliser des gants pour effectuer les tests.
10. Les réactifs contiennent du thimérol à 0,02 % utilisé comme conservateur. Ils doivent donc être manipulés conformément aux consignes données par les laboratoires.
11. La contamination microbienne des réactifs peut réduire l'exactitude de l'analyse. Éviter la contamination microbienne des réactifs en utilisant des pipettes stériles jetables pour extraire les aliquots des flacons à réactifs.
12. Tous les réactifs, excepté le *Tampon de lavage concentré*, sont fournis dans des flacons prêts à l'emploi. Les réactifs peuvent être dispensés directement à l'aide des compte-gouttes ; ils peuvent également être transvasés puis dispensés à l'aide de pipettes multicanaux. Après transvasement, tout surplus de réactif devra être éliminé. Ne pas réintroduire dans le flacon original. Le *Substrat* doit être conservé dans son récipient opaque d'origine et extrait de ce récipient suivant les besoins. Après extraction, le *Substrat* inutilisé ne doit pas être réintroduit dans son récipient d'origine.
13. Le lavage doit être réalisé suivant les consignes indiquées afin d'éviter toute réaction hors essai.
14. La *Solution d'arrêt* contient 0,6 N d'acide sulfurique. En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau.
15. Le *Substrat* est photosensible et ne doit pas être directement exposé à la lumière solaire ou à une source de rayons UV.
16. Le test a été optimisé dans le sens de la sensibilité et de la spécificité. Procéder conformément à la procédure spécifiée. Toute modification de la procédure spécifiée et/ou des conditions de test peut altérer la sensibilité et la spécificité du test.
17. Les échantillons de selles peuvent contenir des agents potentiellement infectieux et doivent être manipulés selon le « Niveau de biosécurité 2 », comme le recommande le manuel du CDC/NIH, « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories ».

PRÉPARATIONS PRÉLIMINAIRES

1. **Tous les réactifs doivent se trouver à température ambiante avant application dans l'essai.**
2. **Préparer la *Solution de lavage* à 1X.** Le *Tampon de lavage concentré* est fourni sous forme de concentré à 20X (un précipité peut être observé). Verser 50 ml de concentré dans 950 ml d'eau distillée pour obtenir un volume total d'un litre. La *Solution de lavage* à 1X peut être entreposée à une température comprise entre 2 et 8 °C.
3. **Préparation de la bande d'essai.** Chaque bande contient 8 micropuits par bande enduits d'anticorps spécifiques aux antigènes *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp et *E. histolytica*. Chaque échantillon ou solution de contrôle nécessite l'u de ces micropuits enduits. Déterminer le nombre de micropuits à utiliser. Éviter tout contact avec la base des puits. Les puits inutilisés doivent être remis dans l'emballage et ce dernier doit être fermé hermétiquement avec l'agent de dessiccation.

MANIPULATION ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

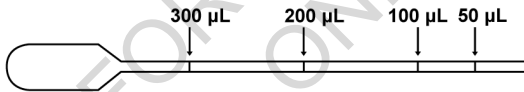
Les procédures standard utilisées sur place pour le prélèvement et la manipulation des échantillons de selles sont appropriées. Il n'est donc pas nécessaire de modifier les méthodes de prélèvement normalement appliquées pour les examens microscopiques O&P.

Types d'échantillons acceptables
Échantillon de selles frais
Échantillons de selles congelés (non dilués)

Ne pas utiliser
Échantillons de selles fixés au formol (par ex. formol à base d'acétate de sodium, formol à 10 %)
Échantillons de selles fixés à l'alcool (par ex. alcool polyvinyle)
Échantillons de selles concentrés

1. Les échantillons non conditionnés doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C et analysés dans les 24 heures suivant le prélèvement. Les échantillons ne pouvant être analysés dans ce délai devront être conservés à ≤ -10 °C. Éviter les cycles de congélation/décongélation répétés. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler à température ambiante.
2. Préparer et étiqueter un tube à essai pour chaque échantillon si nécessaire. **Ajouter 400 μ L de Diluant dans chaque tube.**
3. Se munir d'une pipette de transfert en plastique jetable (fournie dans le kit) pour chaque échantillon.

Pipette de transfert



4. **Mélanger complètement tous les échantillons et les cultures indépendamment de leur consistance. Les échantillons doivent tous être parfaitement mis en suspension avant échantillonnage.** En utilisant la pipette de transfert jetable en plastique, ajouter 100 μ L (deuxième repère gradué) d'échantillon de selles dans le tube contenant le Diluant puis mélanger. Si l'échantillon ne peut pas être transféré à l'aide d'une pipette, prélever environ 0,1 g de matière fécale à l'aide d'un écouvillon. Cette quantité équivaut plus ou moins à la taille d'un petit pois (environ 4 mm de diamètre).
5. Fermer chaque tube d'échantillon dilué et mélanger complètement. Pour obtenir un mélange approprié, procéder par mixage ou agitation du tube plusieurs fois.
6. Avec un équipement de lavage semi-automatique ou automatique, les échantillons doivent être centrifugés (5 000 x g pendant 10 minutes) pour retirer les particules du liquide surnageant avant de les transférer dans les micropuits.

PROCÉDURE DE TEST

1. Placer tous les réactifs et le nombre de bandelettes nécessaires à température ambiante avant de les utiliser.
2. **Préparer les contrôles**
 - a. Contrôles positifs – Agiter chaque flacon de *Contrôle positif* pendant plusieurs secondes puis ajouter une goutte à chaque micropuits de contrôle positif.
 - b. Contrôles négatifs – Ajouter 100 µl de *Diluant* à un autre puits pour servir de contrôle négatif.
3. **À l'aide d'une pipette de transfert neuve pour chaque échantillon, transférer 100 µl d'échantillon dilué dans le micropuits de la microplaque.**
4. Couper le film adhésif plastique à la taille nécessaire pour couvrir les puits. **Recouvrir les puits et les laisser incuber pendant une heure à température ambiante.**
5. Agiter le contenu hors des micropuits dans un réceptacle à déchets.
6. **Nettoyer les micropuits en projetant énergiquement la Solution de lavage 1X à l'aide d'un pulvérisateur à jet continu vers le fond de chaque micropuits.** Remplir les puits puis agiter la *Solution de lavage* hors du puits dans un réceptacle à déchets. Rabattre la plaque à l'envers sur une serviette en papier sèche.
Remarque : avec un équipement de lavage semi-automatique ou automatique, ajouter 350 µl de Solution de lavage 1X dans chaque micropuits. Laver 5 fois
7. Répéter l'étape 6 quatre fois supplémentaires avec une serviette en papier sèche à chaque fois. Si des particules sont visibles dans les micropuits, continuer le lavage jusqu'à disparition complète de ces dernières.
8. Après lavage, éliminer complètement tout liquide résiduel pouvant rester dans les micropuits en rabattant énergiquement la plaque sur une serviette en papier sèche de façon à effacer toute trace de liquide. Éliminer les serviettes en papier et les récipients ayant contenu des échantillons de façon appropriée.
9. **Ajouter 1 goutte (50 µl) de Conjugué (bouchon rouge) dans chaque micropuits.**
10. Fermer hermétiquement à l'aide d'un film adhésif et tapoter légèrement pour mélanger. **Laisser incuber les micropuits à température ambiante pendant 30 minutes.**
11. Après l'incubation, **répéter la procédure de lavage décrite aux étapes 5-8.**
12. **Ajouter 2 gouttes (100 µl) de Substrat (bouchon bleu) dans chaque micropuits** Tapoter légèrement les micropuits pour mélanger le substrat. Laisser incuber les micropuits à température ambiante pendant 10 minutes. Tapoter doucement les puits au bout de 5 minutes.
13. **Ajouter 1 goutte (50 µl) de Solution d'arrêt (bouchon jaune) dans chaque micropuits.** Tapoter légèrement les micropuits et attendre 2 minutes avant de procéder au relevé. Lors de l'adjonction de *Solution d'arrêt*, la couleur bleue vire au jaune. Cette modification peut être quantifiée en mesurant la densité optique à 450 nm sur un lecteur de microplaques ELISA. Le zéro d'absorbance de l'instrument doit être ajusté à l'air. Pour les lecteurs à double longueur d'onde, ajuster le zéro à l'air à 620 nm et effectuer le relevé à 450 nm. Essayer le dessous de chaque micropuits avant de mesurer la densité optique. Si aucun lecteur ELISA n'est disponible, le test peut être lu à l'œil nu avec un bon éclairage sur fond blanc. Effectuer la lecture dans les dix minutes qui suivent l'adjonction de *Solution d'arrêt*.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

- Les contrôles positifs et négatifs doivent être effectués sur chaque série d'analyses d'échantillons. Les contrôles positifs permettent de démontrer le bon fonctionnement du test de détection de chaque antigène parasite dans des échantillons de selles tandis que le contrôle négatif démontre que le test réagit de façon spécifique.
- Les contrôles positifs et négatifs doivent figurer dans les pages respectives, sinon les résultats du test sont invalides.
 - Le contrôle positif doit être de couleur jaune.** Lue sur un spectrophotomètre, la DO à 450 nm ou avec une onde double à 450/620 nm doit être $\geq 0,500$. Si un micropuits donne une lecture positive sans présenter une couleur parfaitement perceptible, le repositionner, essuyer le dessous du micropuits et effectuer une nouvelle lecture.
 - Le contrôle négatif doit être visuellement clair.** Lue sur un spectrophotomètre, la DO à 450 nm doit être $< 0,200$. Lue à 450/620 nm, l'absorbance doit être $< 0,160$. Si ce n'est pas le cas, le test ne peut pas être considéré valide et doit être répété en veillant à effectuer correctement la procédure de lavage.
- Les relevés visuels doivent être effectués dans de bonnes conditions d'éclairage sur fond blanc.
- Les résultats des tests ne peuvent pas être considérés comme valides si les caractéristiques de performance des contrôles positifs et négatifs ne sont pas satisfaites. Si des résultats différents sont observés, contacter nos Services Techniques.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

	Mesure spectrophotométrique	
	Longueur d'onde simple à 450 nm	Longueur d'onde double à 450/620 nm
Négatif	DO $< 0,200$	DO $< 0,160$
Positif	DO $\geq 0,200$	DO $\geq 0,160$

Interprétation visuelle

Le micropuits de contrôle négatif doit être incolore ou de couleur jaune clair. Le micropuits de contrôle positif doit présenter une couleur jaune bien nette. Si des résultats différents sont observés, contacter nos Services Techniques. Un échantillon d'essai est considéré comme positif s'il est de couleur jaune nette par rapport au micropuits de contrôle négatif. Il peut être plus ou moins jaune que la couleur observée dans le micropuits de contrôle positif. Un échantillon d'essai est considéré comme négatif si la réaction est incolore ou moins jaune que le micropuits de contrôle négatif.

Un résultat positif indique que l'antigène *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. et/ou *E. histolytica* est présent dans l'échantillon. Un résultat négatif indique que les antigènes *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. et/ou *E. histolytica* sont absents ou que le niveau est inférieur à la limite de détection du test.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Le test **TRI-COMBO PARASITE SCREEN** détecte la présence des antigènes *Giardia*, *Cryptosporidium* et/ou *E. histolytica* dans les échantillons de selles. Ce test confirme la présence d'antigènes dans les selles et ces informations doivent être examinées par le médecin avec le dossier médical du patient.
- Le test **TRI-COMBO PARASITE SCREEN** permet le dépistage qualitatif de l'antigène *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. et/ou *E. histolytica* dans les échantillons de selles humaines non conditionnés. L'intensité de la couleur ne doit pas être interprétée en termes quantitatifs.

3. Les échantillons de selles concentrés ne doivent pas être utilisés dans le test et risquent de ne pas donner de résultats précis.

VALEURS ATTENDUES

Les individus en bonne santé ne sont normalement pas infectés par la *Giardia*, le *Cryptosporidium* ou l' *E. histolytica* et doivent obtenir un résultat négatif au test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Un résultat de test positif au test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* indique que l'individu sécrète des quantités détectables de l'antigène *Giardia*, *Cryptosporidium* et/ou *E. histolytica*. L'incidence des infections dues à la *Giardia*, au *Cryptosporidium* et à l'*E. histolytica* varie de façon significative en fonction des populations et des zones géographiques. Les enfants fréquentant un environnement de garde présentent des taux d'infection à la *Giardia* plus élevés que la population normale (11). Les homosexuels hommes présentent également des taux d'infection plus élevés (9,12). En général, d'après des études effectuées en laboratoire, l'incidence de la cryptosporidie dans les pays développés est comprise entre 1 et 2 %, cette incidence étant plus élevée chez les enfants. On estime que l'*Entamoeba histolytica* infecte environ 50 millions de personnes dans le monde entier (9). Environ 90 % de ces personnes restent asymptomatiques alors que 10 % présentent des symptômes cliniques allant de maladies gastro-intestinales à des abcès du foie. Les groupes à haut risque incluent des personnes qui ont travaillé à l'étranger, des immigrés, des personnes immunodéficientes, des travailleurs migrants et des homosexuels masculins actifs (9,14). Les souches non pathogènes (*E. dispar*) sont prédominantes chez les homosexuels masculins (15). La maladie est souvent transmise par des porteurs asymptomatiques de l'*E. histolytica*.

EFFICACITÉ DU TEST

La performance du test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* a été comparée à celle d'un panel de dispositifs simples de prédiction pour la détection de parasites (pour la détection de la *Giardia* spp., du *Cryptosporidium* spp. et de l'*E. histolytica*) et comprenait 275 échantillons frais et 645 congelés. Le tableau ci-dessous présente un résumé de la performance clinique du test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* au panel de prédiction. Les résultats révèlent que le test affichait un pourcentage de confirmation positif de 97,8 %, un pourcentage de confirmation négatif de 97,5 % et une confirmation globale de 97,6 %.

<i>n</i> = 920	Panel de prédiction Positif	Panel de prédiction Négatif
<i>TRI-COMBO</i> Positif	307	15
<i>TRI-COMBO</i> Négatif	7	591

	Indice de confiance de 95 %	
Confirmation positive	97,8%	95,3 – 99,0%
Confirmation négative	97,5%	95,9 – 98,6%
Confirmation globale	97,6%	97,3 – 97,8%

REPRODUCTIBILITÉ

La reproductibilité du test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* a été déterminée à partir de 20 échantillons de selles humaines codés pour éviter leur identification pendant le test. Le test a été réalisé dans 2 laboratoires indépendants et sur place au sein de TECHLAB®, Inc. Les

échantillons ont été testés deux fois par jour pendant 5 jours par plusieurs techniciens travaillant sur chaque site avec 2 lots de kits différents. Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été effectués avec chaque panel d'échantillons masqués. Les résultats de chaque laboratoire ont été transmis à TECHLAB®, Inc. et comparés aux résultats internes. Ils étaient cohérents entre les différents sites et ont affiché une corrélation de 100 %. Les échantillons ont donné les résultats prévus sur toute la durée des essais.

RÉACTIVITÉ CROISÉE

La réactivité croisée du test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* a été évaluée avec les souches bactériennes et virales énumérées ci-après. Aucune de ces souches n'a provoqué d'interférence avec le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i> ETEC
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Salmonella enterica</i> typhimurium
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Cowans
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> EIEC	<i>Yersinia enterocolitica</i>

Adénovirus types 1, 2, 3, 5, 40 et 41	Échovirus types 9, 11, 18, 22 et 33
Coronavirus humains	Entérovirus types 68, 70 et 71
Coxsackievirus types B2, B3, B4 et B5	Rotavirus humains

SUBSTANCES INTERFÉRENTES (formules américaines)

Les substances suivantes n'ont pas modifié le résultat positif ou négatif des tests aux concentrations indiquées ci-après : Mucine gastrique de porc (3,5 % p/v), sang humain (40 % v/v), sulfate de baryum (5 % p/v), Imodium (5 % v/v), Kaopectate (5 % v/v), Pepto-Bismol (5 % v/v), Mylanta (5 % v/v), Acide stérique/palmitique (40 % p/v), Métronidazole (0,25 % p/v), Vancomycine (0,25 % p/v).

PRÉCISION – INTRA-ANALYSE

Pour la détermination de l'efficacité intra-analyse, 6 échantillons de selles positifs et 5 échantillons de selles négatifs ont été analysés. Chaque échantillon a été analysé en 8 répétitions. Tous les échantillons positifs le sont restés, de même que tous les échantillons négatifs sont restés négatifs.

PRÉCISION – INTER-ANALYSE

La précision inter-essais du test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* a été déterminée en utilisant 20 échantillons de selles (8 négatifs, 4 *Giardia* positifs, 4 *Cryptosporidium* positifs et 4 *E. histolytica* positifs). Les échantillons ont été testés deux fois par jour pendant 5 jours à l'aide de 2 lots de kit différents. Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été testés chaque jour. Tous les échantillons positifs le sont restés, de même que tous les échantillons négatifs sont restés négatifs.

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

La sensibilité analytique du test a été déterminée en utilisant des courbes de dilution de kystes purifiés ou de trophozoïte dans une matrice de prélèvement. La concentration de kystes *Giardia*, d'ocystes *Cryptosporidium* et de trophozoïtes *E. histolytica* (zymodème pathogène [PZ]) où les échantillons étaient positifs au test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* dans 95 % des cas a été utilisée pour décrire la limite de détection du test (LDD). Les résultats des tests ont déterminé que la limite de détection du test était de 8 000 kystes/ml pour la *Giardia* (équivalent à 160 kystes par test), 40 000 ocystes/ml pour le *Cryptosporidium* (équivalent à 800 ocystes détectés par test) et 3 300 PZ/ml pour l'*E. histolytica* (équivalent à 66 PZ détectés par test). Le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* détectant des antigènes solubles dans les échantillons de selles en plus des kystes, des ocystes et des trophozoïtes, cette étude basée sur les kystes, les ocystes et les trophozoïtes constitue une estimation de sa sensibilité analytique.

FOR INFORMATIONAL USE ONLY

REFERENCES

- Hill, D.R. and T.E. Nash. 1999. Intestinal Flagellate and Ciliate Infections in Tropical Infectious Diseases by R.L. Guerrant, D.H. Walker and P.F. Weller, pp. 703-720.
- Phillips, S. C., D. Mildvan, and D. C. Williams. 1981. Sexual transmission of enteric protozoa and helminths in a venereal disease clinic population. *New Eng. J. Med.* 305:603-606.
- Fayer, R. and L. P. Ungar. 1986. *Cryptosporidium* spp and Cryptosporidiosis. *Micro. Rev.* 50:458-483.
- Meisel, J. L., D. R. Perera, C. Meligro, and C. E. Rubin. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70:1156-60.
- Current, W. L. 1989. Cryptosporidiosis. In: *New Strategies in Parasitology*, (Ed. K. P.W. J.McAdam) Churchill Livingstone pp 257-73.
- Angus, K. W. 1990. Cryptosporidiosis and AIDS. *Clinical Gastroenterol.* 4:425-41.
- Steiner, T.S., J.W. Pape, and R.L. Guerrant. 1999. Intestinal Coccidial Infections in Tropical Infectious Diseases by R.L. Guerrant, D.H. Walker and P.F. Weller, pp. 721-735.
- Garcia, L.S. 2007. Diagnostic Medical Parasitology, pp 6-19.
- Tanyuksel, M. and W.A. Petri, Jr. 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(4):713-729.
- Haque, R., K. Kress, S. Wood, T. Jackson, D. Lyerly, T. Wilkins, and W. A. Petri, Jr. 1993. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. *J. Infect. Dis.* 167:247-249.
- Novotny, T. E., R. S. Hopkins, P. Shillam, and E. N. Janoff. 1990. Prevalence of *Giardia lamblia* and risk factors for infection among children attending day-care facilities in Denver. *Public Health Rep.* 105(1):72-5.
- William, D.C. 1981. Enteric Diseases. *Cutis.* 27(3):278-81, 283-5.
- Bruckner, D. A. 1992. Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:356-369.
- Krogstad, D. J., H. C. Spencer, G. R. Healy, N. N. Gleason, D. J. Sexton, and C. A. Herron. 1978. Amebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. *Ann. Intern. Med.* 88:89-97.
- Tannich, E., and G. D. Burchard. 1991. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*. *J. Clin. Microbiol.* 29:250-255.

Technical Support

Advice Line

Further information can be obtained from your distributor, or by contacting Alere Technical Support on:

Africa, Russia, CIS	+972 8 9429 683	ARCISproductsupport@alere.com
Asia Pacific	+61 7 3363 7711	APproductsupport@alere.com
Canada	+1 800 818 8335	CANproductsupport@alere.com
Europe & Middle East	+44 161 483 9032	EMEproductsupport@alere.com
Latin America	+57 01800 094 9393	LAPproductsupport@alere.com

Developed and
Manufactured by:

TECHLAB®



TECHLAB®, Inc.
2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060-6358, USA



EC REP Emurgo Europe
Molenstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

Distributed by:



Alere North America, LLC.
30 South Keller Road
Orlando, Florida 32810
TEI 1-877-441-7440
1-321-441-7200 OUTSIDE USA

The Alere Logo and Alere are trademarks of the Alere group of companies.

The TECHLAB Logo and TECHLAB are trademarks of TECHLAB®, Inc., under license.

© 2014 TECHLAB®, Inc. All rights reserved.