

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 pruebas)

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*

Made in the USA

Developed and Manufactured by:



2001 Kraft Drive

Blacksburg, VA 24060-6358 USA

www.techlab.com

TEL 1-800-832-4522 USA

TEL 1-540-953-1664 Outside USA

 **EC REP** Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

TRI-COMBO PARASITE SCREEN

INTENDED USE

The TECHLAB® 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 as an aid in the diagnosis of gastrointestinal infection when giardiasis, cryptosporidiosis and amebiasis is suspected. The test does not differentiate between the three parasites and follow-up testing is required for all positive results to confirm the specific diagnosis.

Caution: U.S. Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a physician

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 12-60 µm in diameter, or as a cyst (10-15 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 ova and parasite (O&P) light 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

CONJ	ENZ	Conjugate (7 mL) – Antibodies against antigens of <i>Giardia</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp., and <i>E. histolytica</i> in a buffered protein solution containing 0.05% ProClin® 300 Signal Word: Warning H317: May cause an allergic skin reaction P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501	
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).*	

4

H₂SO₄ | **0.6N**

Stop Solution (7 mL) – 0.6 N sulfuric acid. CAUTION: Avoid contact with skin and eyes; flush with water immediately if contact occurs

Signal Word: Danger

H314: Causes severe skin burns and eye damage

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501

**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) – *Cryptosporidium* antigen in a buffered protein solution with 0.02% thimerosal*

CONTROL | **+**

E. histolytica Positive Control (3.5 mL) – *E. histolytica* 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*

Signal Word: Warning

H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure

H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects

P260, P273, P314, P391, P501

**MA** | **PLT**

Microassay Plate – 12 strips, each consisting of 8 wells coated with antibodies to *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *E. histolytica* antigen (stored with desiccant)

*contains mercury



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

ELISA reader capable of reading at 450 nm or 450/620 nm

Absorbent paper

Small tubes for dilution of fecal specimens (e.g., microcentrifuge tubes)

Applicator sticks

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°C and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

PRECAUTIONS

1. Rx Only – Prescription use only.
2. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
3. 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.
4. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use a kit past the assigned expiration date.
5. Bring all components to ROOM TEMPERATURE BEFORE USE!
6. Do not freeze the reagents. The kit should be stored between 2°C and 8°C.
7. Caps and tips are color-coded; do NOT mix or interchange!
8. When handling assay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
9. Unused microwells must be placed back inside of the resealable pouch with the desiccant and tightly sealed to protect them from moisture.
10. Hold reagent bottles vertically when dispensing to ensure proper drop size and correct volume.

11. 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.
12. 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.
13. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
14. The *Substrate* is light sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources.
15. 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.
16. 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."
17. Handle specimens and used microassay wells as if capable of transmitting infectious agents. Wear disposable gloves when performing the test.
18. Reagents contain 0.02% thimerosal as a preservative and should be handled with normal laboratory caution.
19. The *Conjugate* reagent contains 0.05% ProClin® 300 as a preservative. Although the concentration is low, ProClin® 300 is known to be harmful. If skin irritation or rash occurs, get medical advice/attention. The *20X Wash Buffer Concentrate* contains 0.2% thimerosal as a preservative. Once diluted to normal use concentration this solution is classified as non-hazardous. The *Stop Solution* contains 0.6 N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact with skin or eyes occurs. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. Handle reagents according to existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice. Safety Data Sheets for this product are available upon request, contact technical support.
20. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations. Do not place in trash, dispose of as hazardous waste.

PRELIMINARY PREPARATIONS

1. **All reagents must be at room temperature prior to use in the assay.**
2. **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.
3. **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.

COLLECTION, HANDLING, AND STORAGE OF FECAL SPECIMENS

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 Specimens
Frozen Fecal Specimens (frozen undiluted)
Fecal specimens in transport media (e.g., Cary Blair, C&S)

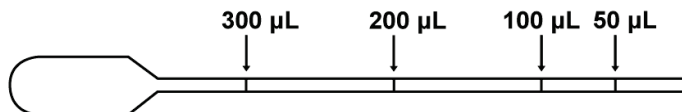
Do Not Use
Fecal specimens in Formalin-based fixative (e.g., Sodium Acetate Formalin, 10% formalin)
Fecal specimens in alcohol-based fixative (e.g., polyvinyl alcohol)
Concentrated Fecal Specimens

Sample Storage Temperature	Acceptable length of storage	Comments
Refrigerated (2°C – 8°C)	10 days	Fresh samples that will be tested within 24 hours may remain at room temperature (18°C – 25°C). If testing is not planned in <24 hours, refrigerate (2°C – 8°C) as soon as possible following collection.
Frozen ≤ - 10°C	8 weeks	Freeze specimens and store at ≤ -10°C if testing cannot be performed within 10 days of collection. Thaw at room temperature. Freezing and thawing multiple times may result in loss of specimen reactivity due to antigen degradation.

Samples in Transport Media	
Storage Condition	Recommended storage time
Samples stored in Cary Blair media between 20°C and 25°C	96 hours
Samples stored in C&S media between 2°C and 8°C	96 hours
Samples stored in C&S media between 20°C and 25°C	48 hours

1. Use standard in-house collection and handling procedures for fecal specimens. Collect fecal specimens in clean, leak-proof containers.
2. Do not store fecal specimens in the *Diluent*.
3. Set up and label one test tube for each sample as necessary. **Add 400 µL *Diluent* to each tube.**
4. Obtain one disposable plastic transfer pipette (supplied with the kit) for each sample.

Transfer Pipette



5. **Mix all specimens thoroughly regardless of consistency – it is essential that the samples be evenly suspended before sampling.**
 - a. For **fresh or frozen/thawed specimens**, using the disposable plastic transfer pipette, add 100 µL (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 4 mm in diameter).

- b. For **specimens in Transport Medium** (e.g., Cary Blair, C&S), add 400 μL of the specimen to the tube containing *Diluent*. This can be achieved by pipetting 200 μL (third graduation mark in above diagram) of specimen TWICE for a total of 400 μL .
6. Thoroughly mix each diluted specimen. Proper mixing can be achieved by vortexing or inverting the tube several times.
7. 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 μL of *Diluent* to an additional well to serve as the negative control.
3. **Using a separate transfer pipette for each specimen, transfer 100 μL 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 μL 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 μL) 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 μL) 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 μL) 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.

8

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 or have a faint yellow color.** 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 a visible 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 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.
4. Due to the small number of positive specimens collected during the prospective clinical study, performance characteristics for *E. histolytica* and *Cryptosporidium* spp. were also established with retrospective clinical specimens.

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

Prospective Study

The performance of the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test was evaluated at three independent sites. The three sites yield a total of 14 microscopy positive samples (13 *Giardia* and one *E. histolytica*). The remaining 740 samples were negative. Of the 740 negative samples, four were *E. histolytica* positive by molecular comparison only but were negative by the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test, negative by microscopy, and negative by FDA-cleared antigen test for *E. histolytica*. Table 1 summarizes the performance observed, which is primarily a study to evaluate specificity due to the low number of positive specimens (see retrospective study for evaluation of sensitivity). Prospective testing was also read visually and performance was not significantly different from spectrophotometric readings.

Table 1. Summary of prospective clinical performance comparing the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test to microscopy for *Giardia*, *Cryptosporidium* and *E. histolytica*

<i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> (N = 754)	Microscopy	
	Positive	Negative
Positive	13	14*
Negative	1	726
		95% Confidence Limits
Sensitivity	92.9%	68.5% - 98.7%
Specificity	98.1%	96.9% - 98.9%
Specimens Positive for <i>Giardia</i> by microscopy/ Specimens Detected by the <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>		12/13
Specimens Positive for <i>E. histolytica</i> by microscopy/ Specimens Detected by the <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>		1/1

* The fourteen *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* positives that were microscopy negative were confirmed to be positive for *Giardia* with an alternate FDA-cleared antigen test or by PCR with sequencing.

Retrospective Study

Testing consisted of 96 archived specimens previously collected and frozen from one clinical site. The frozen samples are included in the bank based on being characterized as microscopy and PCR positive. The specimens were collected from an *E. histolytica* endemic area and contained specimens also positives for *Giardia* and *Cryptosporidium*. Table 2 summarizes the performance observed. Retrospective testing was also read visually and performance was not significantly different from spectrophotometric readings.

Table 2. Summary of retrospective clinical performance comparing the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test to Microscopy and PCR

<i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> (N = 96)	Microscopy and PCR	
	Positive	Negative
Positive	85	0
Negative	5	6
		95% Confidence Limits
Sensitivity	94.4%	87.7% - 97.9%
Specificity	100%	61.0% - 100%
Specimens Positive for <i>Giardia</i> / Specimens Detected by the <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>		41/41
Specimens Positive for <i>Cryptosporidium</i> / Specimens Detected by the <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>		27/30
Specimens Positive for <i>E. histolytica</i> / Specimens Detected by the <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>		28/30

Note: Eight specimens were dual positive for *Giardia* and *E. histolytica* by the Microscopy and PCR and tested positive in the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test. Three specimens were dual positive for *Giardia* and *Cryptosporidium* by Microscopy and PCR and tested positive in the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test.

The prospective study results were analyzed by considering composite results from multiple tests that consisted of light microscopy, molecular testing consisting of a commercial FDA-cleared device and PCR with sequencing for the identification of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., in addition to identification and subspeciation of *E. histolytica*. This testing was mainly done because identification of *E. histolytica* organisms cannot be determined solely by microscopy because it is morphologically indistinguishable from the non-pathogenic *E. dispar*. Use of an alternate molecular testing is needed to confirm *Entamoeba* speciation. The molecular testing algorithm used provides a comparator method that is highly sensitive at the detection of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *E. histolytica*. The performance is summarized in table 3 and is presented as positive percent agreement and negative percent agreement.

Table 3. Summary of prospective clinical performance comparing the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test to microscopy and molecular testing

<i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> (N = 754)	Microscopy and Molecular testing	
	Positive	Negative
Positive	18	9*
Negative	11**	716
		95% Confidence Limits
Positive Percent Agreement	62.1%	44.0% - 77.3%
Negative Percent Agreement	98.8%	97.7% - 99.4%

Specimens Positive for <i>Giardia</i> / Specimens Detected by the <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	17/24
Specimens Positive for <i>E. histolytica</i> / Specimens Detected by the <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	1/5
Specimens Positive for <i>Cryptosporidium</i> / Specimens Detected by the <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	0/0

* These nine specimens were tested with an alternate FDA cleared antigen test resulting in 9/9 *Giardia* determined to be antigen positive.

** These eleven specimens were tested with an alternate FDA cleared antigen test resulting in 6/7 *Giardia* and 4/4 *E. histolytica* were determined to be antigen negative.

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 99.9%. The samples produced the expected results 99.9% 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>Enterococcus faecalis</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Escherichia coli</i> EIEC	(Cowan's)
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli</i> EPEC	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Escherichia coli</i> ETEC	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Shigella flexneri</i>	
Calicivirus	Human Coxsackievirus B2, B3, B4, B5	
Cytomegalovirus	Human Echovirus 9	
Echovirus 11, 18, 33	Human Enterovirus 68, 69, 70, 71	
Human Adenovirus 1, 2, 3, 5, 40, 41	Human parechovirus 1 [Echovirus 22]	
Human Coronavirus	Human Rotavirus	

Additionally, the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test was run on fecal specimens documented to be positive for other parasites by microscopy. The number in parentheses is the quantity of each organism found in the clinical specimens. No cross reactivity was seen with the following organisms.

<i>Ascaris lumbricoides</i> and with eggs (22)	<i>Entamoeba moshkovskii</i> (3)
<i>Blastocystis hominis</i> (11)	<i>Iodamoeba bütschlii</i> (10)
<i>Entamoeba bangladeshi</i> (3)	<i>Trichuris trichiura</i> eggs (12)
<i>Entamoeba coli</i> (16)	

Cross reactivity with Norovirus is unknown because it was not tested in analytical studies. However, Norovirus GI/GII was identified in 34 clinical specimens and Enterotoxigenic *E. Coli* - ETEC LT/ST was identified in 107 clinical specimens, using an FDA cleared multiplex NAAT assay during clinical testing and no cross reactivity was found using the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* in those samples.

Strain Specific Study

Due to the similarity in morphology between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba* species, 3 specimens identified by PCR as positive for non-pathogenic *Entamoeba moshkovskii* and 3 positive for non-pathogenic *Entamoeba bangladeshi* were evaluated using the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test. These 6 specimens tested negative in the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test.

INTERFERING SUBSTANCES (U.S. FORMULATION)

The following substances had no effect on positive or negative *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test results analyzed at the concentrations indicated: Barium sulfate (5% w/v), Benzalkonium Chloride (1% w/v), Ciprofloxacin (0.25% w/v), Ethanol (1% w/v), Hog gastric mucin (3.5% w/v), Human blood (40% v/v), Hydrocortisone (1% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Leukocytes (0.05% w/v), Maalox® Advanced (5% v/v), Mesalazine (10% w/v), Metronidazole (0.25% w/v), Mineral Oil (10% w/v), Mylanta® (4.2 mg/mL), Naproxen Sodium (5% w/v), Nonoxynol-9 (1% w/v), Nystatin (1% w/v), Palmitic Acid/Fecal Fat (40% w/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), Phenylephrine (1% w/v), Polyethylene glycol 3350 (10% w/v), Prilosec OTC® (5 µg/mL), Sennosides (1% w/v), Simethicone (10% w/v), Stearic Acid/Fecal Fat (40% w/v), Tagamet® (5 µg/mL), TUMS® (50 µg/mL), Human Urine (5% v/v), and Vancomycin (0.25% w/v).

PRECISION – INTRA-ASSAY

For the determination of intra-assay performance, 24 fecal samples were analyzed by the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test. The samples included 2 negative, 2 high negative, 2 low positive, and 2 moderate positive samples for each analyte. Each specimen was assayed a total of five times using two different kit lots. Positive specimens consistently tested positive and negative specimens consistently tested negative. High negative samples tested within 95% agreement of each other for all three analytes.

PRECISION – INTER-ASSAY

For the determination of inter-assay performance, 24 fecal samples were analyzed by the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test. The samples included 2 negative, 2 high negative, 2 low positive, and 2 moderate positive samples for each analyte. The samples were tested twice a day by multiple technicians over a 12-day period using 2 different kit lots. All positive samples remained positive and all negative samples remained negative.

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity of the test was determined by using purified *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *E. histolytica* pathogenic zymodemes in a sample matrix. The concentration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *E. histolytica* pathogenic zymodemes in fecal matrix at which specimens were positive by the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test 95% of the time was the assay limit-of-detection (LoD). Test results determined the LoD for the assay to be 8450 cysts/mL of feces for *Giardia* (equivalent to 169 cysts detected per test), 47,962 oocysts/mL of feces for *Cryptosporidium* (equivalent to 959 oocysts detected per test), and 1,676 PZs/mL (equivalent to 34 PZs detected per test).

For fecal matrix/Cary Blair, the LoD for the assay was determined to be 34,155 cysts/mL of feces for *Giardia* (equivalent to 427 cysts detected per test), 99,456 oocysts/mL of feces for *Cryptosporidium* (equivalent to 1243 oocysts detected per test), and 4655 PZs/mL (equivalent to 58 PZs detected per test). For fecal matrix/C&S, the LoD for the assay was determined to be 37,095 cysts/mL of feces for *Giardia* (equivalent to 464 cysts detected

per test), 122,299 oocysts/mL of feces for *Cryptosporidium* (equivalent to 1529 oocysts detected per test), and 3948 PZs/mL (equivalent to 49 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.

FRESH VERSUS FROZEN SAMPLES

The effect of long term frozen specimen storage on antigen stability was evaluated. For the analysis, a total of 39 fecal samples were tested with the *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test. The samples consisted of negative fecal samples, high negative fecal samples, low positive fecal samples, moderate positive fecal samples, and high positive fecal samples. Samples were prepared by spiking a negative fecal pool with *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, or *E. histolytica* pathogenic zymodemes at respective concentrations and stored at $\leq -10^{\circ}\text{C}$. These samples were tested at 0, 1, 4 and 8 weeks. No conversion of positive-to-negative or negative-to-positive was observed in any of the samples at the specified time points.

PROZONE

To ensure that a high concentration of analyte does not interfere with a positive reaction in *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* test, high samples were prepared by spiking a negative fecal pool with *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, or *E. histolytica* pathogenic zymodemes, and then tested. A total of 5 different dilutions of each, up to and including the clinically observed high concentration, were prepared and tested in triplicate. The results demonstrated that there was no overall prozone affect, that elevated levels of analyte did not affect the detection of each organism.

TRI-COMBO PARASITE SCREEN

USO PREVISTO

El ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* de *TECHLAB*® 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 como ayuda en el diagnóstico de infección gastrointestinal cuando se sospecha de giardiasis, criptosporidiosis y amebiasis. El ensayo no distingue entre los tres parásitos y se precisan pruebas adicionales para todos los resultados positivos para confirmar el diagnóstico específico.

Atención: Las leyes federales de EE.UU. restringen la venta de este producto a facultativos o bajo prescripción médica.

FUNDAMENTO

Giardia es un parásito protozooario, binucleado, flagelado que existe en dos formas: un trofozoíto no infeccioso con forma de pera (de 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 huésped 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 pequeños, los pacientes inmunocomprometidos y las personas sin una exposición anterior (1).

Cryptosporidium es un parásito protozooario 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 a través del ooquiste 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 de 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 con materia fecal. La criptosporidiosis 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 criptosporidiosis 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 criptosporidiosis puede causar una enfermedad prolongada y potencialmente mortal debido a la pérdida excesiva de líquidos (7). En estos pacientes, la infección puede también propagarse a los tractos respiratorio y biliar (5).

El ciclo vital de *Entamoeba histolytica* es parecido al de otras amebas. El organismo existe como trofozoíto, de 12 a 60 µm de diámetro, o como quiste (10-15 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 la 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* patógena 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 la giardiasis, la criptosporidiosis y la amebiasis ha sido el diagnóstico mediante microscopia óptica 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, los cuales podrían no estar presentes en todas las muestras. Además, sólo rara vez es posible distinguir entre las especies patógenas y no patógenas de *Entamoeba* mediante microscopia. La tasa de éxito del análisis fecal mediante microscopia 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 microscopia, la toma de muestras y el análisis del líquido duodenal puede detectar trofozoítos, 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 de *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 los antígenos y el conjugado.

MATERIALES SUMINISTRADOS

CONJ ENZ

Conjugado (7 ml) – anticuerpos frente a antígenos de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium*, y de *E. histolytica* en una solución proteínica tamponada con ProClin® 300 al 0,05 %

Indicación de advertencia: Advertencia

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501

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 0.6N

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

Indicación de advertencia: Peligro

H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353,

P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501

CONTROL +

Control positivo de Giardia (3,5 ml) – antígeno de *Giardia* en una solución proteínica tamponada que contiene 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 de fosfato, detergente y tiomersal al 0,2 %*

Indicación de advertencia: Advertencia

H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas

H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P260, P273, P314, P391, P501

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)

*contiene mercurio

**ACCESORIOS**

100 pipetas de transferencia de plástico desechables

2 hojas de plástico adhesivas

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

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

Papel absorbente

Tubos pequeños para la dilución de muestras fecales

Varillas aplicadoras

(p. ej., tubos de microcentrífuga)

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. Producto sujeto a prescripción médica
2. Para uso diagnóstico *in vitro*. Exclusivamente para uso profesional.
3. 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.
4. No deben mezclarse los reactivos de kits diferentes. No utilice los kits después de la fecha de caducidad asignada.
5. ANTES DEL USO, deje que todos los componentes alcancen la TEMPERATURA AMBIENTE.
6. No congele los reactivos. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C.
7. Los tapones y las puntas están codificados con colores y NO deben mezclarse ni intercambiarse.
8. Cuando se manipulen pocillos de ensayo, evitar el rascado del fondo de los pocillos, ya que esto podría causar lecturas de absorbancia elevadas.
9. Los micropocillos no utilizados se introducirán de nuevo en la bolsa resellable junto con el desecante y se cerrarán herméticamente para protegerlos de la humedad.
10. Al verter los reactivos, sujete los frascos en posición vertical para asegurar el tamaño adecuado de las gotas y el volumen correcto.
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. El *sustrato* es sensible a la luz y debe protegerse de la luz solar directa o de fuentes de UV.
15. 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.
16. 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".
17. Manipular las muestras y los pocillos de microanálisis utilizados como potenciales transmisores de agentes infecciosos. Utilice guantes desechables para realizar la prueba.
18. Los reactivos contienen tiomersal al 0,02 % como conservante y se manipularán según las normas habituales de precaución de laboratorio.
19. El reactivo *conjugado* contiene ProClin® 300 al 0,05 % como conservante. Aunque la concentración es baja, se sabe que ProClin® 300 es nocivo. En caso de irritación o erupción cutánea, consultar a un médico. El *tampón de lavado concentrado 20X* contiene tiomersal al 0,2 % como conservante. Una vez diluida hasta la concentración de uso normal, esta solución se clasifica como no peligrosa. La *solución de parada* contiene ácido sulfúrico 0,6 N. Aclarar con agua inmediatamente en caso de contacto con la piel o los ojos. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Manejar los reactivos de acuerdo con las normas existentes de seguridad de laboratorio y buenas prácticas de laboratorio. Se dispone de fichas de datos de seguridad de este producto bajo pedido; consultar al servicio técnico.
20. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos. No lo tire a la basura, elimínelo como residuo peligroso.

PREPARACIONES PRELIMINARES

1. **Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de su uso en el análisis.**
2. **Preparar la 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 y 950 ml de agua destilada. La *solución de lavado* 1x puede conservarse entre 2 y 8 °C.
3. **Preparación de la tira de ensayo.** 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 el desecante.

RECOGIDA, MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS FECALES

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

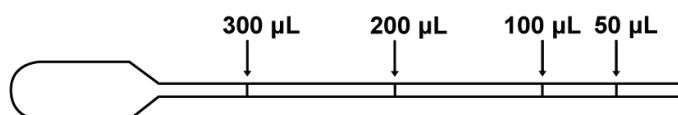
Tipos de muestra aceptables	No utilizar
Muestras fecales recientes	Muestras fecales en fijador basado en formol (p. ej.: formol acetato sódico, formol al 10 %)
Muestras fecales congeladas (congeladas no diluidas)	Muestras fecales en fijador basado en alcohol (p. ej.: alcohol polivinílico)
Muestras fecales en medios de transporte (p. ej.: Cary Blair, C&S)	Muestras fecales concentradas

Temperatura de conservación de la muestra	Duración aceptable de la conservación	Comentarios
Refrigerada (2 °C – 8 °C)	10 días	Las muestras recientes que se analizarán en 24 horas pueden permanecer a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C). Si no está previsto analizarlas en menos de 24 horas, se deben refrigerar (2 °C – 8 °C) en cuanto sea posible tras su recogida.
Congelada ≤ - 10 °C	8 semanas	Congele las muestras y consérvelas a ≤ -10°C si el test no puede realizarse en los 10 días siguientes a la recogida de la muestra. Descongelar a temperatura ambiente. La realización de múltiples ciclos de congelación y descongelación puede provocar la pérdida de reactividad de la muestra debido a la degradación del antígeno.

Muestras en medios de transporte	
Condiciones de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento recomendado
Muestras almacenadas en medios Cary Blair entre 20 °C y 25 °C	96 horas
Muestras almacenadas en medios C&S entre 2°C y 8°C	96 horas
Muestras almacenadas en medios C&S entre 20°C y 25°C	48 horas

1. Utilice los procedimientos estándar de recogida y manipulación de las muestras fecales utilizados a nivel interno. Recoja las muestras fecales en recipientes limpios y a prueba de fugas.
2. No conserve las muestras fecales en el *diluyente*.
3. Asigne e identifique un tubo de ensayo para cada muestra según sea necesario.
Añadir 400 µl de *diluyente* a cada tubo.
4. Utilice una pipeta de transferencia de plástico desechable (suministradas con el kit) para cada muestra.

Pipeta de transferencia



5. **Mezcle bien todas las muestras independientemente de su consistencia, ya que es muy importante obtener una suspensión homogénea de las muestras antes de tomar las muestras.**
 - a. Para muestras **recientes o congeladas/descongeladas**: usando la pipeta de plástico desechable, añadir 100 µl (segunda marca de graduación) de la muestra fecal al tubo que contiene diluyente y mezclar bien. Si la muestra no puede pipetarse, 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).
 - b. Para muestras **en medios de transporte** (p.ej.: Cary Blair, C&S): añadir 400 µl de la muestra al tubo que contiene *diluyente*. Esto puede llevarse a cabo pipeteando 200 µl (tercera marca de graduación del diagrama anterior) de la muestra DOS VECES hasta alcanzar el total de 400 µl.
6. Mezcle bien cada muestra diluida. Mezcle adecuadamente con vórtex o invirtiendo el tubo varias veces.
7. 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 DE LA PRUEBA

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

6. **Lavar cada pocillo con la solución de lavado 1x en un frasco con rociador con boquilla de punta fina**, dirigiendo con fuerza la *solución de lavado* al fondo del pocillo. Llenar los pocillos y a continuación vaciar la *solución de lavado* de los pocillos a un contenedor de desechos. Golpear la placa invertida sobre un papel absorbente seco.
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 un papel absorbente seco. 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 un papel absorbente seco hasta que no salga más líquido. Eliminar adecuadamente el papel absorbente y los contenedores de muestras.
9. **Añadir 1 gota (50 µl) de conjugado (tapón rojo) 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 dos gotas (100 µl) de sustrato (tapón 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 una gota (50 µl) de solución de parada (tapón amarillo) 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 dual, 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 dual) debe ser $\geq 0,500$. Todo pocillo que dé una lectura positiva sin color visible deberá ser colocado de nuevo, se deberá limpiar la parte inferior del mismo para limpiar la humedad y se leerá nuevamente.
 - b. **El control negativo debe ser visualmente transparente o tener un ligero color amarillo.** 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 dual 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 visible. 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 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. La intensidad del color no debe interpretarse cuantitativamente.
3. No deben utilizarse muestras fecales concentradas en el ensayo y podrían no dar resultados exactos.
4. Debido al número reducido de muestras positivas recogidas durante el estudio clínico prospectivo, las características de rendimiento para especies de *E. histolytica* y *Cryptosporidium* también se estableció con muestras clínicas retrospectivas.

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 la 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 criptosporidiosis 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 unos 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 incluyen a personas que han viajado al extranjero, inmigrantes, personas inmunocomprometidas, trabajadores extranjeros y homosexuales activos (9,14). Las cepas no patógenas (*E. dispar*) son las predominantes entre los varones homosexuales (15). Con frecuencia la enfermedad se transmite a través de portadores asintomáticos de *E. histolytica*.

Estudio prospectivo

Se evaluó el rendimiento del ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* en tres centros independientes. Los tres centros dieron un total de 14 muestras positivas por microscopia (13 *Giardia* y una *E. histolytica*). Las otras 740 muestras fueron negativas. De las 740 muestras negativas, cuatro fueron positivas para *E. histolytica* por comparación molecular únicamente pero fueron negativas mediante el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*, negativas mediante microscopia y negativas mediante el ensayo con antígenos aprobado por la FDA para *E. histolytica*. La tabla 1 resume el rendimiento observado, que es principalmente un estudio para evaluar la especificidad debida al bajo número de muestras positivas (ver el estudio retrospectivo para la evaluación de la sensibilidad). El ensayo prospectivo también se leyó visualmente y el rendimiento no fue diferente significativamente de las lecturas espectrofotométricas.

Tabla 1. Resumen del rendimiento clínico prospectivo en la comparación del ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* con microscopia para *Giardia*, *Cryptosporidium* y *E. histolytica*

<i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> (N = 754)	Microscopia	
	Positivo	Negativo
Positivo	13	14*
Negativo	1	726

		Límites de confianza del 95 %
Sensibilidad	92,9 %	68,5 % - 98,7 %
Especificidad	98,1 %	96,9 % - 98,9 %

Muestras positivas para <i>Giardia</i> mediante microscopia/ Muestras detectadas mediante <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	12/13
Muestras positivas para <i>E. histolytica</i> mediante microscopia/ Muestras detectadas mediante <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	1/1

* Los catorce positivos por *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* que fueron negativos por microscopia se confirmaron como positivos para *Giardia* con un ensayo alternativo con antígenos aprobado por la FDA o mediante RCP con secuenciación.

Estudio retrospectivo

El ensayo se compuso de 96 muestras archivadas previamente recogidas y congeladas de un centro clínico. Las muestras congeladas se incluyen en el banco en función de estar caracterizadas como positivos por microscopia y por RCP. Las muestras se recogieron de una zona endémica de *E. histolytica* y contenían muestras también positivas para *Giardia* y *Cryptosporidium*. La Tabla 2 resume el rendimiento observado. El ensayo retrospectivo también se leyó visualmente y el rendimiento no fue significativamente diferente de las lecturas espectrofotométricas.

Tabla 2. Resumen del rendimiento clínico retrospectivo en la comparación del ensayo TRI-COMBO PARASITE SCREEN con microscopia y RCP

TRI-COMBO PARASITE SCREEN (N = 96)	Microscopia y RCP	
	Positivo	Negativo
Positivo	85	0
Negativo	5	6

		Límites de confianza del 95 %
Sensibilidad	94,4 %	87,7 % - 97,9 %
Especificidad	100 %	61,0 % - 100 %

Muestras positivas para <i>Giardia</i> / Muestras detectadas mediante TRI-COMBO PARASITE SCREEN	41/41
Muestras positivas para <i>Cryptosporidium</i> / Muestras detectadas mediante TRI-COMBO PARASITE SCREEN	27/30
Muestras positivas para <i>E. histolytica</i> / Muestras detectadas mediante TRI-COMBO PARASITE SCREEN	28/30

Nota: Ocho muestras fueron doble positivas para *Giardia* y *E. histolytica* mediante microscopia y RCP y en el ensayo TRI-COMBO PARASITE SCREEN fueron positivas. Tres muestras fueron doble positivas para *Giardia* y *Cryptosporidium* mediante microscopia y RCP y en el ensayo TRI-COMBO PARASITE SCREEN fueron positivas.

Los resultados del estudio prospectivo se analizaron considerando los resultados compuestos de múltiples ensayos que consistieron en microscopia óptica, ensayos moleculares que consisten en un dispositivo comercial aprobado por la FDA y RCP con secuenciación para la identificación de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium*, además de la identificación y subespeciación de *E. histolytica*. Este ensayo se realizó principalmente porque la identificación de organismos de *E. histolytica* no se puede determinar únicamente por microscopia ya que es morfológicamente indistinguible de la *E. dispar* no patógena. Es necesario utilizar un ensayo molecular alternativo para confirmar la especiación de *Entamoeba*. El algoritmo de ensayo molecular utilizado proporciona un método comparador que es altamente sensible en la detección de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidium* y *E. histolytica*. El rendimiento se resume en la tabla 3 y se presenta como concordancia porcentual positiva y concordancia porcentual negativa.

Tabla 3. Resumen del rendimiento clínico prospectivo en la comparación del ensayo TRI-COMBO PARASITE SCREEN con el ensayo molecular y de microscopia

TRI-COMBO PARASITE SCREEN (N = 754)	Ensayo molecular y de microscopia	
	Positivo	Negativo
Positivo	18	9*
Negativo	11**	716

		Límites de confianza del 95 %
Concordancia porcentual positiva	62,1 %	44,0 % - 77,3 %
Concordancia porcentual negativa	98,8 %	97,7 % - 99,4 %

Muestras positivas para <i>Giardia</i> / Muestras detectadas mediante <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	17/24
Muestras positivas para <i>E. histolytica</i> / Muestras detectadas mediante <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	1/5
Muestras positivas para <i>Cryptosporidium</i> / Muestras detectadas mediante <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	0/0

* Estas nueve muestras se analizaron con un ensayo alternativo con antígenos aprobado por la FDA que dio como resultado 9/9 en *Giardia* determinados como positivos con antígenos.

** Estas once muestras se analizaron con un ensayo alternativo con antígenos aprobado por la FDA que dio como resultado 6/7 en *Giardia* y 4/4 en *E. histolytica* determinados como negativos con antígenos.

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 los resultados internos. Los resultados fueron coherentes entre los diferentes laboratorios y mostraron una correlación del 99,9 %. Las muestras produjeron los resultados esperados en el 99,9 % de 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>Enterococcus faecalis</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Escherichia coli</i> EIEC	(Cowan's)
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli</i> EPEC	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Escherichia coli</i> ETEC	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Shigella flexneri</i>	

Adenovirus humano 1, 2, 3, 5, 40, 41	Echovirus humano 9
Calicivirus	Enterovirus humano 68, 69, 70, 71
Citomegalovirus	Parechovirus humano 1 [Echovirus 22]
Coronavirus humano	Rotavirus humano
Echovirus 11, 18, 33	Virus de Coxsackie humano B2, B3, B4, B5

Además, se realizó el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* en muestras fecales documentadas como positivas para otros parásitos al microscopio. El número en paréntesis es la cantidad de cada organismo detectado en las muestras clínicas. No se detectó reactividad cruzada con los siguientes organismos.

<i>Ascaris lumbricoides</i> y sus huevos (22)	<i>Entamoeba moshkovskii</i> (3)
<i>Blastocystis hominis</i> (11)	Huevos de <i>Trichuris trichiura</i> (12)
<i>Entamoeba bangladeshi</i> (3)	<i>Iodamoeba bütschlii</i> (10)
<i>Entamoeba coli</i> (16)	

La reactividad cruzada con norovirus se desconoce porque no se probó en los estudios analíticos. Sin embargo, se identificó el norovirus GI/GII en 34 muestras clínicas y se identificó *E. Coli* - ETEC LT/ST enterotoxigénica en 107 muestras clínicas, utilizando un ensayo NAAT multiplex aprobado por la FDA durante los ensayos clínicos, y no se demostró reactividad cruzada utilizando el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* en esas muestras.

Estudio específico de cepa

Debido a la morfología similar entre especies patógenas y no patógenas de *Entamoeba*, se evaluaron 3 muestras identificadas mediante RCP como positivas para *Entamoeba moshkovskii* no patógena y 3 positivas para *Entamoeba bangladeshi* no patógena utilizando el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Estas 6 muestras dieron resultados negativos en la prueba *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*.

SUSTANCIAS INTERFERENTES (FORMULACIÓN DE EE.UU.)

Las siguientes sustancias no tuvieron ningún efecto en los resultados positivos o negativos de la prueba *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* analizadas a las concentraciones indicadas: sulfato de bario (5 % p/v), cloruro de benzalconio (1 % p/v), ciprofloxacino (0,25 % p/v), etanol (1 % p/v), mucina gástrica de cerdo (3,5 % p/v), sangre humana (40 % v/v), hidrocortisona (1 % p/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), leucocitos (0,05 % p/v), Maalox® Advanced (5 % v/v), mesalazina (10 % p/v), metronidazol (0,25 % p/v), parafina líquida (10 % p/v), Mylanta® (4,2 mg/ml), naproxeno sódico (5 % p/v), nonoxinol-9 (1 % p/v), nistatina (1 % p/v), ácido palmítico/grasa fecal (40 % p/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), fenilefrina (1 % p/v), polietilenglicol 3350 (10 % p/v), Prilosec OTC® (5 µg/ml), senósidos (1 % p/v), simeticona (10 % p/v), ácido esteárico/grasa fecal (40 % p/v), Tagamet® (5 µg/ml), TUMS® (50 µg/ml), orina humana (5 % v/v) y vancomicina (0,25 % p/v).

PRECISIÓN INTRAANALÍTICA

Para la determinación del rendimiento intraanalítico se analizaron veinticuatro muestras fecales mediante el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Se analizaron 2 muestras negativas, 2 muestras negativas de nivel alto, 2 muestras positivas de nivel bajo y 2 muestras positivas de nivel moderado para cada analito. Cada muestra se ensayó un total de cinco veces utilizando dos lotes de kit diferentes. Las muestras positivas dieron de forma constante resultados positivos y las muestras negativas dieron de forma constante resultados negativos. Las muestras negativas de nivel alto dieron una concordancia del 95 % entre sí para los tres analitos.

PRECISIÓN INTERANALÍTICA

Para la determinación del rendimiento interanalítico se analizaron veinticuatro muestras fecales mediante el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Se analizaron 2 muestras negativas, 2 muestras negativas de nivel alto, 2 muestras positivas de nivel bajo y 2 muestras positivas de nivel moderado para cada analito. Las muestras se analizaron dos veces al día, por parte de varios técnicos, durante un período de 12 días, usando 2 lotes de kit diferentes. Todas las muestras positivas seguían siendo positivas y todas las muestras negativas seguían siendo negativas.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica del ensayo se determinó utilizando quistes de *Giardia* purificados, ooquistes de *Cryptosporidium* y zimodemas patógenas de *E. histolytica* en una matriz de muestra. Se utilizó la concentración de quistes de *Giardia*, ooquistes de *Cryptosporidium* y zimodemas patógenas de *E. histolytica* en matriz fecal a la que las muestras fueron positivas en el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* el 95 % de las veces para establecer el límite de detección (LD) del ensayo. Los resultados del ensayo determinaron que el LD del análisis es de 8450 quistes/ml de heces para *Giardia* (equivalente a 169 quistes detectados por ensayo), 47.962 ooquistes/ml de heces para *Cryptosporidium* (equivalente a 959 ooquistes detectados por ensayo) y 1.676 ZP/ml (equivalente a 34 ZP detectados por ensayo). Para la matriz fecal/Cary Blair, los

resultados del ensayo determinaron que el LD del análisis es de 34.155 quistes/ml de heces para *Giardia* (equivalente a 427 quistes detectados por ensayo), 99.456 ooquistes/ml de heces para *Cryptosporidium* (equivalente a 1243 ooquistes detectados por ensayo) y 4655 ZP/ml (equivalente a 58 ZP detectados por ensayo). Para la matriz fecal/C&S, los resultados del ensayo determinaron que el LD del análisis es de 37.095 quistes/ml de heces para *Giardia* (equivalente a 464 quistes detectados por ensayo), 122.299 ooquistes/ml de heces para *Cryptosporidium* (equivalente a 1529 ooquistes detectados por ensayo) y 3948 ZP/ml (equivalente a 49 ZP detectados por ensayo).

Dado que el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* detecta antígeno soluble en muestras fecales, además de quistes, ooquistes y trofozoítos, este estudio del LD representa una estimación de la sensibilidad analítica.

MUESTRAS RECIENTES FRENTE A MUESTRAS CONGELADAS

Se evaluó el efecto de la conservación prolongada de muestras congeladas en la estabilidad del antígeno. Se analizaron un total de 39 muestras fecales mediante el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Se utilizaron muestras fecales negativas, muestras fecales de nivel negativo alto, muestras fecales de nivel positivo bajo, muestras fecales de nivel positivo moderado y muestras fecales de nivel positivo elevado. Se prepararon muestras mediante el enriquecimiento de una mezcla fecal negativa con quistes de *Giardia*, ooquistes de *Cryptosporidium* o zimodemas patógenas de *E. histolytica* a las concentraciones respectivas y se almacenaron a ≤ -10 °C. Estas muestras se analizaron a las 0, 1, 4 y 8 semanas. No se observó ninguna conversión de positivo a negativo ni de negativo a positivo en ninguna de las muestras en los momentos especificados.

PROZONA

Para garantizar que una concentración elevada de analito no interfiere con una reacción positiva en el ensayo *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*, se prepararon muestras de nivel alto mediante el enriquecimiento de una mezcla fecal negativa con quistes de *Giardia*, ooquistes de *Cryptosporidium* o zimodemas patógenas de *E. histolytica* y, a continuación, se analizaron. Se prepararon y analizaron por triplicado un total de 5 diluciones distintas de cada uno, llegando hasta, e incluyendo, la concentración elevada observada clínicamente. Los resultados demostraron que no hubo ningún efecto prozona en general, que los niveles elevados de analito no afectaron a la detección de cada organismo.

TRI-COMBO PARASITE SCREEN

VERWENDUNGSZWECK

Der TECHLAB® TRI-COMBO PARASITE SCREEN Test ist ein Enzymimmunoassay für den gleichzeitigen qualitativen Nachweis von *Giardia* spp.-, *Cryptosporidium* spp.- und/oder *E. histolytica*-Antigen in menschlichen Stuhlproben. Der Test dient als Hilfsmittel bei der Diagnose gastrointestinaler Infektionen mit Verdacht auf Giardiose, Kryptosporidiose und Amöbiasis. Der Test bietet keine Differenzierung zwischen den drei Parasiten. Bei positiven Ergebnissen sind weitere Tests erforderlich, um eine spezifische Diagnose zu stellen.

Achtung: Gemäß US-Bundesgesetz ist der Verkauf dieses Produkts an Ärzte bzw. auf Anordnung eines Arztes beschränkt

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 (Zusammenfassung in 1). 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 verseuchtes Wasser verantwortlich. Es wurde die Einschleppung von Giardiose aus endemischen Gebieten durch Reisende beobachtet. Die Übertragung geschieht auch durch direkten Kontakt, besonders mit asymptomatischen Trägern und durch verseuchte Nahrungsmittel. Giardiose ist auch eine weit verbreitete sexuell übertragbare Krankheit (2). Die Kontamination mit tierischen Fäkalien, insbesondere von Wasser, stellt einen weiteren Übertragungsweg beim Menschen dar (1).

Die klinischen Manifestationen der Giardiose reichen von der asymptomatischen Trägerschaft mit der Weitergabe von Zysten bis hin 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 Wirbeltierparasit, von dem man ursprünglich annahm, dass er nur bei Tieren Durchfall 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 Reisediarrhö darstellt. Die Erkrankung wird durch die dickwandige Oozystenform übertragen, die einen Durchmesser von 2-6 µm aufweist und gegen die gängigen Desinfektionsmittel und die routinemäßige Chlorierung des Trinkwassers erstaunlich resistent 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. Kryptosporidiose ist eine schwere, opportunistische Infektion bei Patienten mit erworbenem Immunschwächesyndrom (AIDS) und wird möglicherweise auch sexuell übertragen (5,6).

Klinische Manifestationen der Kryptosporidiose sind choleraartiger Durchfall, Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Gewichtsverlust. Bei gesunden Personen ist die Infektion in der Regel von kurzer Dauer und selbstlimitierend. Bei AIDS-Patienten und anderen immungeschwächten Personen kann sich Kryptosporidiose 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 12-60 µm oder als Zyste (10-15 µm) auf (8). Der Mensch fungiert als wichtigster Träger, entweder über die Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder verseuchtem 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 gewebeerstörende 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 ist antigenisch konserviert, die Adhäsine von pathogenen *E. histolytica* und nicht-pathogenen *E. dispar* können jedoch anhand von monoklonalen Antikörpern unterschieden werden (Zusammenfassung in 9).

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 häufigere parasitär bedingte Krankheits- und Todesursachen darstellen. In den meisten Fällen handelt es sich um eine Infektion mit *E. dispar*, das nicht mit einer Erkrankung in Zusammenhang gebracht worden ist. 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 sind schätzungsweise rund 10 % der halben Milliarde an Infizierten pro Jahr mit *E. histolytica* infiziert. Bei den Betroffenen manifestieren sich typische Symptome; Kolitis und Leberabszesse treten auf, die zu einer Sterberate 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 inadäquaten und unnötigen Behandlung mit starken Arzneimitteln mit Nebenwirkungen führen.

Patienten mit pathogenen *E. histolytica* können ein breites Symptomenpektrum aufweisen. Bei manchen ist der Krankheitsverlauf völlig asymptomatisch. Diese Personen scheiden täglich Millionen von Zysten aus und stellen damit ein Verbreitungsreservoir 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 Gewebebeschädigung, die dabei auftreten kann, kommt es möglicherweise zu einem Darmdurchbruch, und die Amöben können sich in andere Körperteile ausbreiten. Bei etwa 10 % der Patienten mit einer invasiven Amöbiasis bilden sich Leberabszesse (10).

Die Diagnose mittels lichtmikroskopischem Nachweis von Ova und Parasiten (O&P) stellt bislang das gängige Verfahren für den Nachweis von Giardiose, Kryptosporidiose 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 arbeitsintensiv 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 Waschschritte entfernt. Nach der Zugabe von *Substrat* wird durch die Enzym-Antikörper-Antigen-Komplexe, die sich in Gegenwart von Antigenen und Konjugat gebildet haben, eine Färbung nachgewiesen.

PACKUNGSGEHALT

CONJ	ENZ	Konjugat (7 ml) – Antikörper gegen Antigene von <i>Giardia</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp. und <i>E. histolytica</i> in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,05 % ProClin® 300 Signalwort: Warnung H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501	
DIL	SPE	Verdünnungspuffer (50 ml) – gepufferte Proteinlösung mit 0,02 % Thimerosal. Der Verdünnungspuffer wird auch als negative Kontrolllösung verwendet (siehe TESTVERFAHREN).*	
H ₂ SO ₄	0.6N	Stopplösung (7 ml) – 0,6 N Schwefelsäure. VORSICHT: Kontakt mit der Haut vermeiden; im Falle eines Hautkontakts sofort mit Wasser abspülen Signalwort: Warnung H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501	
CONTROL	+	Giardia Positive Kontrolle (3,5 ml) – <i>Giardia</i> -Antigen in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02 % Thimerosal*	
CONTROL	+	Cryptosporidium Positive Kontrolle (3,5 ml) – <i>Cryptosporidium</i> -Antigen in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02 % Thimerosal*	
CONTROL	+	E. histolytica Positive Kontrolle (3,5 ml) – <i>E. histolytica</i> -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* Signalwort: Warnung H373: Kann bei längerer H411: Giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. P260, P273, P314, P391, P501	 
MA	PLT	Mikrotiterplatte – 12 Streifen, 8 Kavitäten pro Streifen, beschichtet mit Antikörpern gegen <i>Giardia</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp.- und <i>E. histolytica</i> -Antigen (mit Trockenmittel gelagert)	

*enthält Quecksilber



ZUBEHÖR

100 Einweg-Transferpipetten aus Kunststoff
1 Waschlösungsetikett

2 Kunststoffklebefolien

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT ENTHALTEN)

Spritzflasche für das Waschreagens

950 ml destilliertes Wasser zur Verdünnung des Waschreagens

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

Reagenzröhrchen zur Stuhlprobenverdünnung (z. B.

Mikrozentrifugenröhrchen)

Vortex-Schüttler

Abfallbehälter

Saugpapier

Applikatorstäbchen

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. Verschreibungspflichtig
2. *In-vitro*-Diagnostikum. Nur für den professionellen Gebrauch.
3. Sämtliche Bestandteile des Kits müssen auf Anzeichen für Undichtigkeit untersucht werden. Bei Erhalt muss das Kit darauf untersucht werden, dass die Komponenten nicht wegen unsachgemäßer Transportbedingungen gefroren oder zu warm sind.
4. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen. Verwenden Sie das Testkit nicht nach dem jeweiligen Verfallsdatum.
5. Lassen Sie alle Bestandteile VOR DER VERWENDUNG RAUMTEMPERATUR annehmen!
6. Reagenzien nicht einfrieren. Das Kit muss zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden.
7. Verschlüsse und Spitzen sind farbkodiert; NICHT vertauschen!
8. Achten Sie bei der Handhabung der Kavitäten darauf, diese nicht zu verkratzen, da dies zu erhöhten Absorptionsmesswerten führen kann.
9. Ungebrauchte Kavitäten der Mikrotiterplatte müssen mit Trockenmittel zurück in den wiederverschließbaren Beutel gegeben und fest verschlossen werden, damit sie vor Feuchtigkeit geschützt sind.
10. Halten Sie die Reagenzflaschen bei der Reagenzienaussgabe senkrecht, um eine angemessene Tropfengröße und korrekte Menge sicherzustellen.
11. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien kann die Genauigkeit des Tests beeinträchtigen. Vermeiden Sie mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien durch Verwendung steriler Einweg-Pipetten für die Reagenzienentnahme aus den Flaschen.
12. Mit Ausnahme des *Waschpuffer-Konzentrats* 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. Das *Substrat* ist lichtempfindlich und muss vor direktem Sonnenlicht und UV-Quellen geschützt werden.
15. Der Test wurde hinsichtlich seiner 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.
16. 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.
17. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Kavitäten als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Schutzhandschuhe.
18. Die Reagenzien enthalten 0,02 % Thimerosal als Konservierungsstoff und sind gemäß üblicher Laborpraxis mit Vorsicht zu behandeln.
19. Das *Konjugat* enthält 0,05 % ProClin® 300 als Konservierungsstoff. Auch wenn die Konzentration gering ist, ist ProClin® 300 als schädlich bekannt. Bei Hautreizung oder -rötung, ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Das *20-fache (20x) Waschpufferkonzentrat* enthält 0,2 % Thimerosal als Konservierungsstoff. Sobald sie auf normale Gebrauchskonzentration verdünnt ist, wird diese Lösung als ungefährlich eingestuft. Die *Stopplösung* enthält 0,6 N Schwefelsäure. Sofort mit Wasser spülen, wenn es zu Kontakt mit der Haut oder den Augen kommt. Kontaminierte

- Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Reagenzien gemäß vorhandenen Vorschriften für die Laborsicherheit und gute Laborpraxis behandeln. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage erhältlich. Wenden Sie sich an den Kundendienst.
20. Befolgen Sie alle geltenden nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung. Nicht zum Hausmüll geben, als gefährlichen Abfall entsorgen.

VORBEREITUNGEN

- Vor der Verwendung müssen alle Reagenzien Raumtemperatur angenommen haben.**
- Bereiten Sie die einfach konzentrierte (1x) Waschlösung 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.
- 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 Kavitäten müssen zurück in den Folienbeutel gegeben und mit Trockenmittel gut verschlossen werden.

ENTNAHME, HANDHABUNG UND LAGERUNG VON STUHLPROBEN

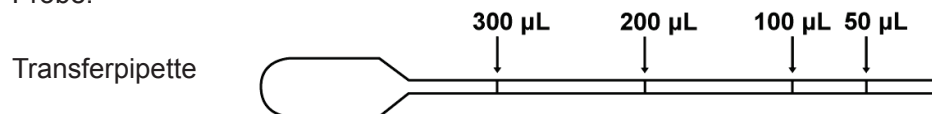
Die üblichen Methoden zur Entnahme und Handhabung von Stuhlproben sind geeignet. Die Entnahmemethoden für die zur Untersuchung von Ova und Parasiten üblichen Mikroskopieverfahren können unverändert übernommen werden.

Akzeptable Probentypen	Nicht verwenden
Frische Stuhlproben	Stuhlproben in Fixiermittel auf Formalinbasis (z. B. Natriumacetat-Formalin, Formalin 10 %)
Gefrorene Stuhlproben (gefroren unverdünnt)	Stuhlproben in Fixiermittel auf Alkoholbasis (z. B. Polyvinylalkohol)
Stuhlproben in Transportmedien (z. B. Cary Blair, C&S)	Konzentrierte Stuhlproben

Probenlagerungstemperatur	Akzeptable Lagerdauer	Anmerkungen
Gekühlt (2 °C – 8 °C)	10 Tage	Frische Proben, die innerhalb von 24 Stunden getestet werden, können bei Raumtemperatur gelagert werden (18 °C – 25 °C). Werden die Proben nicht innerhalb von 24 Stunden getestet, müssen sie so rasch wie möglich nach der Entnahme gekühlt gelagert werden (2 °C – 8 °C).
Gefroren bei ≤ 10 °C	8 Wochen	Frieren Sie die Proben bei ≤ -10 °C ein, wenn der Test nicht innerhalb von 10 Tagen nach der Entnahme durchgeführt werden kann. Bei Raumtemperatur auftauen. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen kann zu einem Reaktivitätsverlust aufgrund von Antigenabbau führen.

Proben in Transportmedien	
Lagerungsbedingungen	Empfohlene Lagerungszeit
Proben in Cary Blair Medium zwischen 20 °C und 25 °C	96 Stunden
Proben in C&S Medien zwischen 2 °C und 8 °C	96 Stunden
Proben in C&S Medien zwischen 20 °C und 25 °C	48 Stunden

1. Verwenden Sie die üblichen internen Methoden zur Entnahme und Handhabung von Stuhlproben. Für die Entnahme der Stuhlproben sind saubere, dichte Behälter zu verwenden.
2. Stuhlproben nicht im *Verdünnungspuffer* lagern.
3. Verwenden Sie für jede Stuhlprobe ein eigenes Reagenzglas und kennzeichnen Sie es. **Geben Sie 400 µl *Verdünnungspuffer* in jedes Reagenzglas.**
4. Sie benötigen 1 Einweg-Kunststofftransferpipette (im Lieferumfang enthalten) für jede Probe.



5. **Mischen Sie alle Proben unabhängig von ihrer Konsistenz gründlich durch – eine gleichmäßige Suspension der Proben vor dem Übertragen ist unbedingt erforderlich.**
 - a. **Frische oder gefrorene/aufgetaute Stuhlproben:** Geben Sie mithilfe der Einweg-Kunststofftransferpipette 100 µL (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. 4mm).
 - b. **Proben in Transportmedien** (z. B. Cary Blair, C&S): Geben Sie 400 µL Probe in das Reagenzglas mit dem Verdünnungspuffer. Pipettieren Sie hierzu ZWEIMAL jeweils 200 µL (3. Markierung auf der Abbildung oben) Probe, um insgesamt 400 µL zu erhalten.
6. Jede verdünnte Probe gründlich durchmischen. Gründliches Mischen erzielen Sie mittels Vortexen oder mehrmaliges Umdrehen des Reagenzglases.
7. Bei Verwendung halbautomatischer oder automatischer Waschgeräte müssen die verdünnten Proben zur Entfernung von Partikeln aus dem Überstand vor dem Übertragen in die Kavitäten zentrifugiert 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 **separaten Transferpipette für jede Probe in die Testkavität der Mikrotiterplatte.**
4. Schneiden Sie die Kunststoffklebefolie so zurecht, dass sie 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. **Spülen Sie jede Kavität mit der 1x Waschlösung aus einer Spritzflasche mit feiner Düse**, indem Sie den Strahl der *Waschlösung* jeweils kräftig auf den Boden der Kavität richten. Füllen Sie die Kavitäten und schütteln Sie die *Waschlösung* aus der Kavität in eine Abfallschale aus. Klopfen Sie die umgedrehte Platte auf einem trockenen Papiertuch aus.
Hinweis: Bei Verwendung eines halbautomatischen bzw. automatischen Waschgeräts geben Sie 350 µl 1x Waschlösung in jede Kavität. Insgesamt fünf 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 auf einem trockenen Papiertuch ausklopfen, bis keine Flüssigkeit mehr austritt. Entsorgen Sie die Papiertücher und Probenbehältnisse ordnungsgemäß.
9. **Geben Sie einen Tropfen (50 µl) Konjugat (roter Verschluss) in jede Kavität.**
10. Verschließen Sie die Platte mit einer Kunststoffklebefolie und klopfen Sie zum Mischen sanft dagegen. **Inkubieren Sie die Kavitäten 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur.**
11. Nach dem Inkubieren **wiederholen Sie die in den Schritten 5 bis 8 beschriebenen Waschschriffe.**
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* schlägt die blaue Färbung in eine gelbe Färbung um. Dieser Effekt kann quantifiziert werden, indem die optische Dichte mit einem ELISA-Lesegerät bei 450 nm 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 vor einem weißen Hintergrund visuell abgelesen werden. Lesen Sie innerhalb von zehn 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 beim Nachweis des jeweiligen Parasiten-Antigens in menschlichen Stuhlproben ordnungsgemäß 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 $\geq 0,500$ sein. Kavitäten, die einen positiven Messwert, aber keine sichtbare Färbung ergeben, müssen neu positioniert, an der Unterseite abgewischt und nochmals abgelesen werden.
 - b. **Die Negative Kontrolle muss optisch farblos sein oder eine schwach gelbe Färbung aufweisen.** Wenn mit einem Spektrophotometer abgelesen wird, muss die optische Dichte bei 450 $< 0,200$ sein. 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 gutem Licht 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.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

Visuelle Auswertung

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 Stuhlproben vorgesehen. Die Farbintensität darf nicht quantitativ interpretiert werden.
3. Konzentrierte Stuhlproben dürfen nicht getestet werden; sie liefern keine genauen Ergebnisse.
4. Aufgrund der geringen Anzahl an positiven Proben, die bei der prospektiven klinischen Studie entnommen wurden, wurden die Leistungsdaten für *E. histolytica* und *Cryptosporidium* spp. auch mit retrospektiven klinischen Proben bestimmt.

ERWARTUNGSWERTE

Normale, gesunde Personen sollten nicht mit *Giardia*, *Cryptosporidium* oder *E. histolytica* infiziert sein und im *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* ein negatives Ergebnis liefern. Ein positives Ergebnis im *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 Kryptosporidiose in Industrieländern insgesamt zwischen 1 % und 2 %, mit einer größeren Häufigkeit bei Kindern. Schätzungen gehen davon aus, dass

weltweit etwa 50 Millionen Personen mit *Entamoeba histolytica* infiziert 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

Prospektive Studie

Die Leistung des *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* Tests wurde an drei unabhängigen Standorten beurteilt. An den drei Standorten ergaben sich insgesamt 14 positive Proben aus der mikroskopischen Analyse (13 *Giardia* und 1 *E. histolytica*). Die restlichen 740 Proben waren negativ. Von den 740 negativen Proben waren 4 nur beim molekularen Vergleich positiv für *E. histolytica*, jedoch negativ im *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*, in der mikroskopischen Analyse sowie in einem von der FDA zugelassenen Antigentest für *E. histolytica*. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der beobachteten Leistung. Es handelt sich in erster Linie um eine Studie zur Beurteilung der Spezifität aufgrund der geringen Anzahl an positiven Proben (siehe retrospektive Studie zur Beurteilung der Sensitivität). Die prospektive Testergebnisse wurden auch visuell abgelesen und die Leistung zeigte keinen wesentlichen Unterschied zu den spektrophotometrischen Messwerten.

Tabelle 1. Zusammenfassung der prospektiven klinischen Leistung aus dem Vergleich des *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* mit Mikroskopie für *Giardia*, *Cryptosporidium* und *E. histolytica*

<i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> (N = 754)	Mikroskopie	
	Positiv	Negativ
Positiv	13	14*
Negativ	1	726
		95%-Konfidenzgrenzen
Sensitivität	92,9 %	68,5 % - 98,7 %
Spezifität	98,1 %	96,9 % - 98,9 %
<i>Giardia</i> -positive Proben mittels Mikroskopie/ mit dem <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> nachgewiesene Proben		12/13
<i>E. histolytica</i> -positive Proben mittels Mikroskopie/ mit dem <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> nachgewiesene Proben		1/1

* Die 14 Proben, die mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* positiv und bei der mikroskopischen Analyse negativ waren, wurden mit einem alternativen, von der FDA zugelassenen Antigentest oder mittels PCR mit Sequenzierung als positiv für *Giardia* bestätigt.

Retrospektive Studie

Die Studie umfasste 96 archivierte Proben, die zuvor an einem klinischen Standort entnommen und eingefroren worden waren. Die gefrorenen Proben sind in der Probenbank enthalten und wurden mittels Mikroskopie und PCR als positiv charakterisiert. Die Proben stammten aus einem *E. histolytica*-endemischen Gebiet und umfassten Proben, die auch für *Giardia* und *Cryptosporidium* positiv waren. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der beobachteten Leistung. Die retrospektiven Testergebnisse wurden auch visuell abgelesen und die Leistung zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den spektrophotometrischen Messwerten.

Tabelle 2. Zusammenfassung der retrospektiven klinischen Leistung aus dem Vergleich des TRI-COMBO PARASITE SCREEN mit Mikroskopie und PCR

TRI-COMBO PARASITE SCREEN (N = 96)	Mikroskopie und PCR	
	Positiv	Negativ
Positiv	85	0
Negativ	5	6
		95%-Konfidenzgrenzen
Sensitivität	94,4 %	87,7 % - 97,9 %
Spezifität	100 %	61,0 % - 100 %
<i>Giardia</i> -positive Proben/ vom TRI-COMBO PARASITE SCREEN nachgewiesene Proben		41/41
<i>Cryptosporidium</i> -positive Proben/ vom TRI-COMBO PARASITE SCREEN nachgewiesene Proben		27/30
<i>E. histolytica</i> -positive Proben/ vom TRI-COMBO PARASITE SCREEN nachgewiesene Proben		28/30

Hinweis: Acht Proben waren mikroskopisch und in der PCR sowohl positiv für *Giardia* als auch für *E. histolytica* und ergaben mit dem TRI-COMBO PARASITE SCREEN ein positives Ergebnis. Drei Proben waren bei Mikroskopie und PCR sowohl positiv für *Giardia* als auch *Cryptosporidium* und ergaben mit dem TRI-COMBO PARASITE SCREEN ein positives Ergebnis.

Die Ergebnisse aus der prospektiven Studie wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus einer Reihe von Tests, einschließlich Lichtmikroskopie, eines molekularen Tests in Form eines von der FDA zugelassenen handelsüblichen Tests und einer PCR mit Sequenzierung für die Identifizierung von *Giardia* spp. und *Cryptosporidium* spp. zusätzlich zur Identifizierung und Subspeziation von *E. histolytica*, analysiert. Dieser Test wurde hauptsächlich deswegen durchgeführt, weil *E. histolytica*-Organismen nicht allein mittels Mikroskopie identifiziert werden können, da sie morphologisch von nicht-pathogenen *E. dispar*-Stämmen nicht unterscheidbar sind. Daher ist eine alternative molekulare Testmethode zur Bestätigung der *Entamoeba*-Speziation erforderlich. Der für den molekularen Test verwendete Algorithmus bietet eine Vergleichsmethode mit hoher Sensitivität für den Nachweis von *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. und *E. histolytica*. Die Leistung ist in Tabelle 3 zusammengefasst und als positive und negative prozentuale Übereinstimmung dargestellt.

Tabelle 3. Zusammenfassung der prospektiven klinischen Leistung aus dem Vergleich des TRI-COMBO PARASITE SCREEN mit Mikroskopie und molekularem Test

TRI-COMBO PARASITE SCREEN (N = 754)	Mikroskopie und molekularer Test	
	Positiv	Negativ
Positiv	18	9*
Negativ	11**	716
		95%-Konfidenzgrenzen
Positive Übereinstimmung in %	62,1 %	44,0 % - 77,3 %
Negative Übereinstimmung in %	98,8 %	97,7 % - 99,4 %

<i>Giardia</i> -positive Proben/ vom <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> nachgewiesene Proben	17/24
<i>E. histolytica</i> -positive Proben/ vom <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> nachgewiesene Proben	1/5
<i>Cryptosporidium</i> -positive Proben/ vom <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> nachgewiesene Proben	0/0

* Diese neun Proben wurden mit einem alternativen, von der FDA zugelassenen Antigentest getestet. 9 von 9 *Giardia* wurden als Antigen-positiv bestimmt.

** Diese elf Proben wurden mit einem alternativen, von der FDA zugelassenen Antigentest getestet. 6 von 7 *Giardia* und 4 von 4 *E. histolytica* wurden als Antigen-negativ bestimmt.

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. übermittelt und mit den internen Ergebnissen verglichen. Die Ergebnisse der verschiedenen Standorte waren durchgehend konsistent und ergaben eine Korrelation von 99,9 %. Die Proben lieferten zu 99,9 % 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*.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Escherichia coli</i> EIEC	(Cowan's)
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli</i> EPEC	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Escherichia coli</i> ETEC	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Shigella flexneri</i>	

Calicivirus	Humanes Coxsackievirus B2, B3, B4, B5
Cytomegalovirus	Humanes Echovirus 9
Echovirus 11, 18, 33	Humanes Enterovirus 68, 69, 70, 71
Humanes Adenovirus 1, 2, 3, 5, 40, 41	Humanes Parechovirus 1 [Echovirus 22]
Humanes Coronavirus	Humanes Rotavirus

Zudem wurden Stuhlproben mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* getestet, die bei der Mikroskopie ein positives Ergebnis für andere Parasiten lieferten. Die Zahl in Klammern gibt die Menge der einzelnen Organismen wieder, die in den klinischen Proben nachgewiesen wurde. Bei den folgenden Organismen wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet.

<i>Ascaris lumbricoides</i> m. Eiern (22)	<i>Entamoeba moshkovskii</i> (3)
<i>Blastocystis hominis</i> (11)	<i>Iodamoeba bütschlii</i> (10)
<i>Entamoeba bangladeshi</i> (3)	<i>Trichuris trichiura</i> (Eier) (12)
<i>Entamoeba coli</i> (16)	

Eine Kreuzreaktivität mit Norovirus ist nicht bekannt, da sie in den analytischen Studien nicht getestet wurde. Norovirus GI/GII wurde anhand eines von der FDA zugelassenen Multiplex-NAAT während der klinischen Prüfung in 34 klinischen Proben und enterotoxigene *E. Coli* - ETEC LT/ST in 107 klinischen Proben identifiziert. und es wurde keine Kreuzreaktivität mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* in diesen Proben nachgewiesen.

Stammspezifische Studie

Aufgrund der ähnlichen Morphologie zwischen pathogenen und nicht-pathogenen *Entamoeba*-Spezies wurden 3 Proben, die in der PCR positiv für nicht-pathogene *Entamoeba moshkovskii* waren, und 3 Proben, die positiv für nicht-pathogene *Entamoeba bangladeshi* waren, mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN Test* untersucht. Diese 6 Proben lieferten ein negatives Ergebnis beim *TRI-COMBO PARASITE SCREEN Test*.

STÖRSUBSTANZEN (US-FORMULIERUNGEN)

Die folgenden Substanzen hatten in den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluss auf die positiven oder negativen Testergebnisse des *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*: Bariumsulfat (5 % Gew./Vol.), Benzalkoniumchlorid (1 % Gew./Vol.), Ciprofloxacin (0,25 % Gew./Vol.), Ethanol (1 % Gew./Vol.), Mucin aus dem Schweinemagen (3,5 % Gew./Vol.), Humanblut (40 % Vol./Vol./Vol.), Hydrocortison (1 % Gew./Vol.), Imodium® (5 % Vol./Vol.), Kaopectate® (5 % Vol./Vol.), Leukozyten (0,05 % Gew./Vol.), Maalox® Advanced (5 % Vol./Vol.), Mesalazin (10 % Gew./Vol.), Metronidazol (0,25 % Gew./Vol.), Mineralöl (10 % Gew./Vol.), Mylanta® (4,2 mg/ml), Naproxen-Natrium (5 % Gew./Vol.), Nonoxynol-9 (1 % Gew./Vol.), Nystatin (1 % Gew./Vol.), Palmitinsäure/Stuhlfett (40 % Gew./Vol.), Pepto-Bismol® (5 % Vol./Vol.), Phenylephrin (1 % Gew./Vol.), Polyethylenglykol 3350 (10 % Gew./Vol.), Prilosec OTC® (5 µg/ml), Sennoside (1 % Gew./Vol.), Simeticon (10 % Gew./Vol.), Stearinsäure/Stuhlfett (40 % Gew./Vol.), Tagamet® (5 µg/ml), TUMS® (50 µg/ml), Humanurin (5 % Vol./Vol.) und Vancomycin (0,25 % Gew./Vol.).

INTRA-ASSAY-PRÄZISION

Für die Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurden 24 Stuhlproben mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN Test* untersucht. Die Proben umfassten 2 negative Proben, 2 stark negative Proben, 2 schwach positive Proben und 2 mäßig positive Proben für jeden Analyten. Jede Probe wurde insgesamt 5 Mal anhand von zwei verschiedenen Kitchargen getestet. Alle positiven Proben lieferten durchgehend ein positives Ergebnis und alle negativen Proben durchgehend ein negatives Ergebnis. Die stark negativen Proben ergaben eine Übereinstimmung von 95 % für alle drei Analyten.

INTER-ASSAY-PRÄZISION

Für die Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurden 24 Stuhlproben mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN Test* untersucht. Die Proben umfassten 2 negative Proben, 2 stark negative Proben, 2 schwach positive Proben und 2 mäßig positive Proben für jeden Analyten. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 12 Tagen 2 x täglich von mehreren Laborkräften mit 2 verschiedenen Kitchargen getestet. Alle positiven Proben blieben positiv und alle negativen Proben negativ.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität des Tests wurde anhand von gereinigten *Giardia*-Zysten, *Cryptosporidium*-Oozysten und pathogenen *E. histolytica*-Zymodemen in einer Probenmatrix bestimmt. Die Konzentration an *Giardia*-Zysten, *Cryptosporidium*-Oozysten und pathogenen *E. histolytica*-Zymodemen in einer Stuhlmatrix, bei der Proben mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* in 95% der Fälle positiv waren, war die Nachweisgrenze (NG) des Tests. Anhand der Testergebnisse ergab sich eine NG von 8450 Zysten/ml Stuhl für *Giardia* (entspricht 169 nachgewiesenen Zysten pro Test), 47.962 Oozysten/ml Stuhl für *Cryptosporidium* (entspricht 959 nachgewiesenen Oozysten pro Test) und 1676 PZ/ml (entspricht 34 nachgewiesenen PZ pro Test) Für Stuhlmatrix/Cary Blair ergab sich eine

NG von 34.155 Zysten/ml Stuhl für *Giardia* (entspricht 427 nachgewiesenen Zysten pro Test), 99.456 Oozysten/ml Stuhl für *Cryptosporidium* (entspricht 1243 nachgewiesenen Oozysten pro Test) und 4655 PZ/ml (entspricht 58 nachgewiesenen PZ pro Test). Für Stuhlmatrix/C&S ergab sich eine NG von 37.095 Zysten/ml Stuhl für *Giardia* (entspricht 464 nachgewiesenen Zysten pro Test), 122.299 Oozysten/ml Stuhl für *Cryptosporidium* (entspricht 1529 nachgewiesenen Oozysten pro Test) und 3948 PZ/ml (entspricht 49 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 zu verstehen.

VERGLEICH ZWISCHEN FRISCHEN UND GEFRORENEN PROBEN

Die Wirkung einer Langzeitlagerung gefrorener Proben auf die Antigenstabilität wurde beurteilt. Für die Analyse wurden insgesamt 39 Stuhlproben mit dem *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* getestet. Die Proben umfassten negative Stuhlproben, stark negative Stuhlproben, schwach positive Stuhlproben, mäßig positive Stuhlproben und stark positive Stuhlproben. Die Proben wurde vorbereitet, indem ein negativer Probenpool mit *Giardia*-Zysten, *Cryptosporidium*-Oozysten bzw. pathogenen *E. histolytica*-Zymodemen in den entsprechenden Konzentrationen versetzt und bei ≤ -10 °C gelagert wurde. Diese Proben wurden nach 0, 1, 4 und 8 Wochen getestet. Bei keiner der Proben wurde zu den vorgegebenen Zeitpunkten eine Veränderung von positiv zu negativ bzw. negativ zu positiv festgestellt.

PROZONENEFFEKT

Um eine Interferenz hoher Analytkonzentrationen mit einer positiven Reaktion im *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* Test auszuschließen, wurden hochkonzentrierte Proben vorbereitet, indem ein negativer Probenpool mit *Giardia*-Zysten, *Cryptosporidium*-Oozysten bzw. pathogenen *E. histolytica*-Zymodemen versetzt und dann getestet wurde. Insgesamt wurden jeweils 5 verschiedene Verdünnungen bis zur klinisch beobachteten Höchstkonzentration vorbereitet und in Dreifachbestimmung getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass es zu keinem Prozoneneffekt kam und hohe Analytkonzentrationen den Nachweis der einzelnen Organismen nicht beeinträchtigten.

TRI-COMBO PARASITE SCREEN

UTILISATION PRÉVUE

Le test TECHLAB® 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. Ce test est indiqué pour déterminer la présence éventuelle d'une infection gastro-intestinale due à la lamblase, la cryptosporidie et l'amibiase. Il ne fait pas de distinction entre les trois parasites, et des examens supplémentaires sont nécessaires pour tous les résultats positifs afin de confirmer le diagnostic.

Attention : selon la loi fédérale des États-Unis, ce dispositif ne peut être vendu que par un médecin ou sur ordonnance.

EXPLICATION

Le *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). Le *Giardia* est souvent 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 (5,6).

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 12-60 µm, ou

en tant que kyste (10-15 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 un galactose ou à la lectine liée à la galactosamine D acétyl 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 elles 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 injustifié 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 lamblie, la cryptosporidie et l'amibiase est la détection au microscope optique des œufs et parasites (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'un anticorps monoclonal immobilisé contre l'antigène et le *Conjugué* se compose d'un anticorps polyclonal contre l'antigène. Lors de l'analyse, une quantité aliquote de selles diluées est introduite dans le micropuits. Les anticorps monoclonaux immobilisés se lient aux antigènes du *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 ProClin® 300 0,05 % Mot indicateur : Avertissement H317 : Peut provoquer une allergie cutanée P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501	
DIL	SPE	Diluant (50 mL) – Solution tamponnée et protéinée contenant 0,02 % de thimérosal. Le Diluant est également utilisé comme solution de contrôle négatif (voir PROCÉDURE DE TEST).*	
H ₂ SO ₄	0.6N	Solution d'arrêt (7 mL) – 0,6 N d'acide sulfurique. ATTENTION : éviter tout contact avec la peau et les yeux ; en cas de contact, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau Mot indicateur : Danger H314 : Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501	
CONTROL	+	Contrôle positif Giardia (3,5 mL) – Antigène <i>Giardia</i> dans une solution tamponnée et protéinée avec 0,02 % de thimérosal*.	
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 0,2 % de thimérosal*. Thimerosal* Mot indicateur : Avertissement H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée H411: Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. P260, P273, P314, P391, P501	 
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)	

*contient du mercure



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
950 mL d'eau distillée pour diluer le réactif de lavage
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)

Agitateur vortex
Papier absorbant
Écouvillons
Réceptacle à déchets

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 aussitôt que possible après utilisation.

PRÉCAUTIONS

1. Rx uniquement – Uniquement sur ordonnance.
2. Pour une utilisation diagnostique *in vitro*. Uniquement à usage professionnel.
3. Contrôler tous les éléments du kit afin de vérifier l'absence de fuites. Examiner le kit dès réception afin de vérifier que les éléments ne sont ni glacés ni chauds au toucher suite à des conditions de transports inadéquates.
4. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés. Ne pas utiliser le kit si sa date de péremption est dépassée.
5. Placer tous les composants à TEMPÉRATURE AMBIANTE AVANT UTILISATION !
6. Ne pas congeler les réactifs. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.
7. Les capsules et les embouts sont classés par couleur. Il convient de NE PAS les mélanger ni les échanger !
8. Lors des manipulations, éviter d'érafler le fond des micropuits, toute dégradation pouvant entraîner un relevé d'absorbance élevée.
9. Les micropuits non utilisés doivent être placés dans l'emballage refermable et étanche contenant un agent de dessiccation pour les protéger de l'humidité.
10. Verser les réactifs en tenant les flacons à la verticale de façon à instiller une goutte de taille adéquate et des volumes corrects.
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 maintenu 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. Le *Substrat* est photosensible et ne doit pas être directement exposé à la lumière solaire ou à une source de rayons UV.
15. 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.
16. 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 ».
17. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme tout facteur potentiel de transmission d'agents infectieux. Utiliser des gants jetables pour effectuer le test.
18. Les réactifs contiennent du thimérosal à 0,02 % utilisé comme conservateur. Ils doivent donc être manipulés conformément aux consignes données par les laboratoires.
19. Le *Conjugué* contient du ProClin® 300 0,05 % comme conservateur. Même si la concentration est faible, le ProClin® 300 est connu pour sa nocivité. En cas d'irritation de la peau ou d'éruption cutanée, consulter un médecin. Le *Tampon de lavage concentré 20X* contient du thimérosal 0,2 % comme conservateur. Une fois diluée à une concentration normale d'utilisation, cette solution est classée comme non dangereuse. 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. Les vêtements contaminés doivent être ôtés puis lavés avant d'être réutilisés. Manipuler les réactifs selon les réglementations existantes relatives à la sécurité des laboratoires

et les bonnes pratiques de laboratoire. Les fiches de sécurité de ce produit sont disponibles à la demande. Contacter le support technique.

20. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets. Ne pas les jeter avec les déchets ménagers mais avec les matières dangereuses.

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 de 1 L. 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'un 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.

PRÉLÈVEMENT, MANIPULATION ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

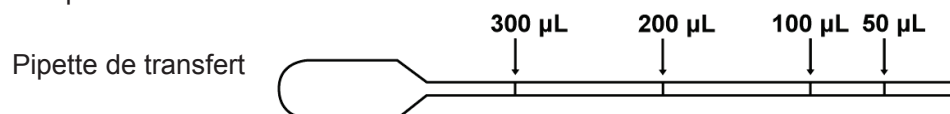
Les procédures standard utilisées sur place pour le prélèvement et la manipulation des échantillons de selles sont appropriées. Il n'est donc pas nécessaire de modifier les méthodes de prélèvement normalement appliquées pour les examens microscopiques O&P.

Types d'échantillons acceptables	Ne pas utiliser
Échantillons de selles frais	Échantillons de selles fixés au formol (par ex., du formol à base d'acétate de sodium, formol à 10 %)
Échantillons de selles congelés (non dilués)	Échantillons de selles fixés à l'alcool (par ex., de l'alcool polyvinyle)
Échantillons de selles dans un milieu de transport (par ex., Cary Blair, C&S)	Échantillons de selles concentrés

Température de stockage des échantillons	Longueur de stockage acceptable	Commentaires
Réfrigérés (2 °C – 8 °C)	10 jours	Les échantillons frais analysés dans les 24 heures peuvent rester à température ambiante (18 °C – 25 °C). Si le test n'est pas prévu dans les 24 heures, réfrigérer les échantillons (2°C – 8°C) le plus rapidement possible après le prélèvement.
Congelés à ≤ 10 °C	8 semaines	Congeler et stocker les échantillons à une température ≤ -10 °C si le test ne peut être réalisé dans un délai de 10 jours après le prélèvement. Décongélation à température ambiante. La multiplication des congélations et décongélation peut entraîner une perte de réactivité de l'échantillon suite à une dégradation de l'antigène.

Échantillons dans un milieu de transport	
Conditions de stockage	Durée de conservation recommandée
Échantillons conservés dans un milieu Cary Blair à 20-25 °C	96 heures
Échantillons conservés dans un milieu C&S à 2-8 °C	96 heures
Échantillons conservés dans un milieu C&S à 20-25 °C	48 heures

1. Respecter les procédures standard internes utilisées sur place pour le prélèvement et la manipulation des échantillons de selles. Prélever les échantillons de selles dans des conteneurs propres et étanches.
2. Ne pas stocker les échantillons de selles dans le *Diluant*.
3. Préparer et étiqueter un tube à essai pour chaque échantillon si nécessaire. **Ajouter 400 µL de *Diluant* dans chaque tube.**
4. Se munir d'une pipette de transfert en plastique jetable (fournie dans le kit) pour chaque échantillon.



5. **Mélanger complètement tous les échantillons indépendamment de leur consistance. Les échantillons doivent tous être parfaitement mis en suspension avant échantillonnage.**
 - a. Pour les échantillons frais ou congelés / décongelés, en utilisant la pipette de transfert jetable en plastique, ajouter 100 µL (deuxième repère gradué) d'échantillon de selles dans le tube contenant le *Diluant*, puis bien 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).
 - b. Pour les échantillons dans un milieu de transport (par ex., Cary Blair, C&S), ajouter 400 µL de l'échantillon dans le tube contenant le *Diluant*. Pour y parvenir, transférer 200 µL (troisième repère gradué sur le schéma ci-dessus) de l'échantillon à l'aide d'une pipette à DEUX reprises pour arriver à une quantité totale de 400 µL.
6. Mélanger soigneusement chaque échantillon dilué. Pour obtenir un mélange approprié, procéder par mixage ou agitation du tube plusieurs fois.
7. 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 **distincte 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. **Verser 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. **Verser 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. Essuyer 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 QUALITÉ

1. 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.
2. Les contrôles positifs et négatifs doivent figurer dans les plages respectives, sinon les résultats du test sont invalides.
 - a. **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.
 - b. **Le contrôle négatif doit être transparent ou présenter une légère coloration jaune.** 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 comme valide et doit être répété en veillant à effectuer correctement la procédure de lavage.
3. Les relevés visuels doivent être pris dans de bonnes conditions d'éclairage sur fond blanc.
4. 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 ≥ 0,200	DO ≥ 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 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

1. 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.
2. Le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* est indiqué pour la détection qualitative de l'antigène *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. et/ou *E. histolytica* dans les échantillons de selles. 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.
4. Étant donné le faible nombre d'échantillons positifs prélevés lors de l'étude clinique prospective, l'efficacité du test pour *E. histolytica* et *Cryptosporidium* spp. a également été établie à partir d'échantillons cliniques rétrospectifs.

VALEURS MOYENNES

Les individus en bonne santé ne sont normalement pas infectés par le *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 au *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 au *Giardia* plus élevés que la population normale (11). Les homosexuels de sexe masculin 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 immigrants, des personnes immunodéficientes, des travailleurs migrants et des homosexuels de sexe masculin actifs (9,14). Les souches non pathogènes (*E. dispar*) sont prédominantes chez les homosexuels de sexe masculin (15). La maladie est souvent transmise par des porteurs asymptomatiques de l'*E. histolytica*.

Étude prospective

L'efficacité du test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* a été évaluée sur trois sites indépendants. Ces trois sites rassemblent au total 14 échantillons analysés par microscopie et déclarés positifs (13 pour *Giardia* et 1 pour *E. histolytica*). Les 740 échantillons restants étaient négatifs. Parmi ces 740 échantillons négatifs, quatre ont été déclarés positifs à l'*E. histolytica* par comparaison moléculaire uniquement, mais ont été déclarés négatifs par le *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*, par analyse microscopique et par un test antigène approuvé par la FDA pour l'*E. histolytica*. Le tableau 1 résume les résultats observés. Cette étude permet principalement d'évaluer la spécificité, en raison du faible nombre d'échantillons positifs (voir l'étude rétrospective pour l'évaluation de la sensibilité). Des tests visuels prospectifs ont également eu lieu, sans différence significative au niveau des performances par rapport aux relevés spectrophotométriques.

Tableau 1. Synthèse de la comparaison prospective des performances cliniques du test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* par rapport à une analyse par microscopie pour le *Giardia*, le *Cryptosporidium* et l'*E. histolytica*

<i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i> (N = 754)	Analyse microscopique	
	Positif	Négatif
Positif	13	14*
Négatif	1	726

		Indice de confiance de 95 %
Sensibilité	92,9 %	68,5 % - 98,7 %
Sensibilité	98,1 %	96,9 % - 98,9 %

Échantillons positifs au <i>Giardia</i> par analyse microscopique/ échantillons détectés par le test <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	12/13
Échantillons positifs à l' <i>E. histolytica</i> par analyse microscopique/ échantillons détectés par le test <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>	1/1

* Les quatorze échantillons déclarés positifs par le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* et déclarés négatifs par l'analyse microscopique ont été confirmés positifs au *Giardia* avec un test antigène alternatif approuvé par la FDA ou par PCR avec séquençage.

Étude rétrospective

L'étude a porté sur 96 échantillons archivés, qui ont été précédemment prélevés et congelés depuis un même site clinique. Les échantillons congelés sont inclus dans la banque en fonction de leur diagnostic positif déterminé par analyse microscopique ou PCR. Les échantillons ont été prélevés dans une région où l'*E. histolytica* est endémique et rassemblent des échantillons qui sont également positifs au *Giardia* et au *Cryptosporidium*. Le tableau 2 résume les résultats observés. Des tests rétrospectifs ont également eu lieu, sans différence majeure au niveau des performances par rapport aux relevés spectrophotométriques.

Tableau 2. Synthèse de la comparaison rétrospective des performances cliniques du test TRI-COMBO PARASITE SCREEN par rapport à une analyse microscopique et à une PCR

TRI-COMBO PARASITE SCREEN (N = 96)	Analyse microscopique et PCR	
	Positif	Négatif
Positif	85	0
Positif	5	6

		Indice de confiance de 95 %
Sensibilité	94,4 %	87,7 % - 97,9 %
Spécificité	100 %	61,0 % - 100 %

Échantillons positifs au <i>Giardia</i> / échantillons détectés par le test TRI-COMBO PARASITE SCREEN	41/41
Échantillons positifs au <i>Cryptosporidium</i> / échantillons détectés par le test TRI-COMBO PARASITE SCREEN	27/30
Échantillons positifs à l' <i>E. histolytica</i> / échantillons détectés par le test TRI-COMBO PARASITE SCREEN	28/30

Remarque: huit échantillons ont été déclarés doublement positifs au *Giardia* et à l'*E. histolytica* par l'analyse microscopique et la PCR et ont été déclarés positifs par le test TRI-COMBO PARASITE SCREEN. Trois échantillons ont été déclarés doublement positifs au *Giardia* et au *Cryptosporidium* par l'analyse microscopique et la PCR et ont été déclarés positifs par le test TRI-COMBO PARASITE SCREEN.

Les résultats de l'étude prospective ont été analysés en tenant compte des résultats composites de plusieurs tests (détection au microscope optique, analyse moléculaire composée d'un dispositif commercial approuvé par la FDA et d'une PCR avec séquençage) pour l'identification du *Giardia* spp. et du *Cryptosporidium* spp., en plus de l'identification et de la sous-spéciation de l'*E. histolytica*. Ce test a principalement eu lieu car l'identification des organismes *E. histolytica* ne peut pas être déterminée exclusivement par analyse microscopique, en raison de sa similarité morphologique avec l'organisme non pathogène *E. dispar*. Il est nécessaire de procéder à des analyses moléculaires alternatives pour confirmer la spéciation de l'*Entamoeba*. L'algorithme d'analyse moléculaire utilisé fournit une méthode de comparaison très sensible à la détection du *Giardia* spp., du *Cryptosporidium* spp. et de l'*E. histolytica*. Les performances sont résumées dans le tableau 3 et sont présentées sous la forme d'un pourcentage de concordance positive et d'un pourcentage de concordance négative.

Tableau 3. Synthèse de la comparaison prospective des performances cliniques du test TRI-COMBO PARASITE SCREEN par rapport à une analyse microscopique et à une analyse moléculaire

TRI-COMBO PARASITE SCREEN (N = 754)	Analyse microscopique et analyse moléculaire	
	Positif	Négatif
Positif	18	9*
Négatif	11**	716

		Indice de confiance de 95 %
Pourcentage de concordance positive	62,1 %	44,0 % - 77,3 %
Pourcentage de concordance négative	98,8 %	97,7 % - 99,4 %
Échantillons positifs au <i>Giardia</i> / échantillons détectés par le test <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>		17/24
Échantillons positifs à l' <i>E. histolytica</i> / échantillons détectés par le test <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>		1/5
Échantillons positifs au <i>Cryptosporidium</i> / échantillons détectés par le test <i>TRI-COMBO PARASITE SCREEN</i>		0/0

* Ces neuf échantillons ont été testés avec un test antigène alternatif approuvé par la FDA.

9 échantillons sur 9 pour le *Giardia* ont été déclarés positifs à l'antigène.

** Ces onze échantillons ont été testés avec un test antigène alternatif approuvé par la FDA.

6 échantillons sur 7 pour le *Giardia* et 4 échantillons sur 4 pour l'*E. histolytica* ont été déclarés négatifs à l'antigène.

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 2 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 99,9 %. Les échantillons ont donné les résultats prévus sur 99,9 % 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>Enterococcus faecalis</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Escherichia coli</i> EIEC	(Cowan's)
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli</i> EPEC	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Escherichia coli</i> ETEC	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Shigella flexneri</i>	

Adénovirus humain 1, 2, 3, 5, 40, 41
Calicivirus
Coronavirus humain
Cytomégalovirus
Échovirus 11, 18, 33

Échovirus humain 9
Entérovirus humain 68, 69, 70, 71
Paréchovirus humain 1 [Échovirus 22]
Rotavirus humain
Virus Cocksackie humain B2, B3, B4, B5

En outre, le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* a été mené sur des échantillons de selles documentés comme positifs pour d'autres parasites par microscopie. Les nombres entre parenthèses correspondent à la quantité de chaque organisme trouvé dans

les échantillons cliniques. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec les organismes suivants.

Ascaris lumbricoides et avec œufs (22)
Blastocystis hominis (11)
Entamoeba bangladeshi (3)
Entamoeba coli (16)

Entamoeba moshkovskii (3)
Iodamoeba bütschlii (10)
 Œufs de *Trichuris trichiura* (12)

La réactivité croisée avec les norovirus est inconnue, puisqu'elle n'a pas été testée lors des études analytiques. Néanmoins, des norovirus GI/GII ont été identifiés dans 34 échantillons cliniques et des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) LT/ST ont été identifiés dans 107 échantillons cliniques, à l'aide d'un test d'amplification des acides nucléiques multiplexe approuvé par la FDA lors de l'étude clinique et aucune réactivité croisée n'a été identifiée avec le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* sur ces échantillons.

Étude spécifique des souches

En raison de la similarité morphologique des espèces d'*Entamoeba* pathogènes et non pathogènes, 3 échantillons identifiés par PCR comme positifs à l'*Entamoeba moshkovskii* non pathogène et 3 échantillons positifs à l'*Entamoeba bangladeshi* non pathogène ont été évalués avec le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Ces 6 échantillons ont obtenu des résultats négatifs au test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*.

SUBSTANCES INTERFÉRENTES (FORMULES AMÉRICAINES)

Les substances suivantes n'ont pas modifié le résultat positif ou négatif des tests *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* aux concentrations indiquées ci-après:

Sulfate de baryum (5 % p/v), chlorure de benzalkonium (1 % v/v), ciprofloxacine (0,25 % p/v), éthanol (1 % v/v), mucine gastrique de porc (3,5 % p/v), sang humain (40 % v/v), hydrocortisone (1 % w/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), leucocytes (0,05 % p/v), Maalox® Advanced (5 % v/v), mesalazine (10 % p/v), métronidazole (0,25 % p/v), huile minérale (10 % p/v), Mylanta® (4,2 mg/mL), sodium de naproxène (5 % p/v), nonoxynol-9 (1 % p/v), nystatine (1 % p/v), acide palmitique/grasses fécales (40 % p/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), phényléphrine (1 % p/v), glycol polyéthylénique 3350 (10 % p/v), Prilosec OTC® (5 µg/mL), sennosides (1 % p/v), siméthicone (10 % p/v), acide stéarique/grasses fécales (40 % p/v), Tagamet® (5 µg/mL), TUMS® (50 µg/mL), urine humaine (5 % v/v), et vancomycine (0,25 % p/v).

PRÉCISION – INTRA-ANALYSE

Pour la détermination des performances intra-analyse, 24 échantillons de selles ont été analysés avec le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Les échantillons incluaient 2 échantillons négatifs, 2 échantillons hautement négatifs, 2 échantillons faiblement positifs et 2 échantillons modérément positifs pour chaque substance à analyser. Chaque échantillon a été analysé cinq fois au total avec deux lots de kits différents. Les échantillons positifs ont systématiquement été testés positifs et les échantillons négatifs se sont systématiquement révélés négatifs. Les échantillons hautement négatifs ont été concordants entre eux à 95 % pour les trois substances à analyser.

PRÉCISION – INTER-ANALYSE

Pour la détermination des performances inter-analyse, 24 échantillons de selles ont été analysés avec le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Les échantillons incluaient 2 échantillons négatifs, 2 échantillons hautement négatifs, 2 échantillons faiblement positifs et 2 échantillons modérément positifs pour chaque substance à analyser. Les échantillons ont été testés 2 fois par jour pendant 12 jours par plusieurs techniciens à l'aide de 2 lots de kits différents. 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 avec des kystes *Giardia* purifiés, des oocystes *Cryptosporidium* et des zymodèmes pathogènes *E. histolytica* dans une matrice de prélèvement. Les concentrations de kystes *Giardia*, d'oocystes *Cryptosporidium* et de zymodèmes pathogènes *E. histolytica* dans la matrice de selles dans laquelle les échantillons étaient positifs dans 95 % des cas au test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* ont été utilisées pour décrire la limite de détection du test (LD). Les résultats des tests ont déterminé que la LD du test était de 8 450 kystes/mL de selles pour le *Giardia* (équivalent à 169 kystes détectés par test), de 47 962 oocystes/mL de selles pour le *Cryptosporidium* (équivalent à 959 oocystes détectés par test) et de 1 676 ZP/mL (équivalent à 34 ZP détectés par test). Pour la matrice de selles/Cary Blair, il a été déterminé que la LD du test était de 34 155 kystes/mL de selles pour le *Giardia* (équivalent à 427 kystes détectés par test), de 99 456 oocystes/mL de selles pour le *Cryptosporidium* (équivalent à 1 243 oocystes détectés par test) et de 4 655 ZP/mL (équivalent à 58 ZP détectés par test). Pour la matrice de selles/C&S, il a été déterminé que la LD du test était de 37 095 kystes/mL de selles pour le *Giardia* (équivalent à 464 kystes détectés par test), de 122 299 oocystes/mL de selles pour le *Cryptosporidium* (équivalent à 1 529 oocystes détectés par test) et de 3 948 ZP/mL (équivalent à 49 ZP détectés par test).

Le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN* détectant des antigènes solubles dans les échantillons de selles en plus des kystes, des oocystes et des trophozoïtes, cette étude de LD constitue une estimation de sa sensibilité analytique.

ÉCHANTILLONS FRAIS OU CONGELÉS

Concernant la stabilité de l'antigène, les effets à long terme de la congélation sur les échantillons ont été évalués. Pour l'analyse, 39 échantillons de selles ont été analysés avec le test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*. Les échantillons se composaient d'échantillons de selles négatifs, d'échantillons de selles hautement négatifs, d'échantillons de selles faiblement positifs, d'échantillons de selles modérément positifs et d'échantillons de selles hautement positifs. Les échantillons ont été préparés en introduisant des concentrations spécifiques de kystes *Giardia*, d'oocystes *Cryptosporidium* ou de zymodèmes pathogènes *E. histolytica* dans un mélange de selles négatif, avant de conserver ce dernier à une température ≤ -10 °C. Ces échantillons ont été testés à 0, 1, 4 et 8 semaines. Aucune conversion d'échantillons positifs en négatifs ou d'échantillons négatifs en positifs n'a été observée sur les échantillons aux périodes indiquées.

PROZONE

Pour garantir l'absence d'interférence entre une concentration élevée de substance à analyser et une réaction positive du test *TRI-COMBO PARASITE SCREEN*, des échantillons élevés ont été préparés en introduisant des kystes *Giardia*, des oocystes *Cryptosporidium* ou des zymodèmes pathogènes *E. histolytica* dans un mélange de selles négatif avant de tester ce dernier. Au total, cinq dilutions différentes de chaque substance, inférieure ou égale à la concentration élevée observée cliniquement, ont été préparées et testées trois fois. Les résultats ont démontré l'absence d'altération prozone générale ainsi que l'absence d'altération des niveaux élevés de substance à analyser sur la détection de chaque organisme.

REFERENCES

1. 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.
2. 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.
3. Fayer, R. and L. P. Ungar. 1986. *Cryptosporidium* spp and Cryptosporidiosis. *Micro. Rev.* 50:458-483.
4. 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.
5. Current, W. L. 1989. Cryptosporidiosis. In: *New Strategies in Parasitology*. (Ed. K. P.W. J. McAdam) Churchill Livingstone pp 257-73.
6. Angus, K. W. 1990. Cryptosporidiosis and AIDS. *Clinical Gastroenterol.* 4:425-41.
7. 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.
8. Garcia, L.S. 2007. Diagnostic Medical Parasitology, pp 6-19.
9. Tanyuksel, M. and W.A. Petri, Jr. 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(4):713-729.
10. 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.
11. 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.
12. William, D.C. 1981. Enteric Diseases. *Cutis.* 27(3):278-81, 283-5.
13. Bruckner, D. A. 1992. Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:356-369.
14. 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.
15. 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

Further information can be obtained by contacting TECHLAB® Technical Support:

US + 1 800 TECHLAB

Phone (540) 953-1664

Fax (540) 953-1665

Email ts@techlab.com

© 2023 TECHLAB, Inc. All rights reserved.

The TECHLAB Logo and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc.