

TABLE OF CONTENTS

English...	1	Product Codes...	13
Spanish...	5	Glossary of Symbols...	13
Italian...	9		

INTENDED USE

Alpha-Tec Systems, Inc. PROTO-FIX® fixative is designed for the collection, transport, and preservation of fecal specimens for permanent staining and concentration procedures to diagnose intestinal parasites.

PROTO-FIX fixative is a clear, colorless, one-vial processing fixative for wet preparations, permanent stains, concentrations, DFA, EIA, and PCR methodologies for fecal specimens, PROTO-FIX is a low-alcohol, low-viscosity fixative containing no heavy metals, PVA, or aniline dyes.

SUMMARY

Intestinal parasitic infections are diagnosed by recovery and identification of protozoan trophozoites and/or cysts or helminth eggs and/or juvenile nematodes. Treatment is based upon positive identification of pathogenic species. As circumstances often prevent immediate examination of fecal specimens, the specimen must be preserved for later examination.

PROTO-FIX fixative is an alternative to the traditional two-vial system of PVA metal fixatives and formalin. PROTO-FIX fixed smears can be stained using modified Wheatley's Trichrome Stain. Protozoan trophozoites, cysts, helminth eggs, and juvenile nematodes can be concentrated using the CONSED® Concentration Procedure of the FEA [formalin ethyl acetate] procedure. The CONSED Concentration Reagent in conjunction with the performance characteristics of PROTO-FIX yield equal or better concentration and staining results than conventional methodologies (PVA and 10% formalin) and provides the convenience and cost savings of a single-vial system. PROTO-FIX fixative has no PVA, mercury, zinc or other heavy metals.

The CONSED Concentration Procedure concentrates all stages of all parasites present in the fecal specimen, including protozoan trophozoites. Trophozoites are clearly visible and identifiable on slides prepared from the concentrated specimen. PROTO-FIX, when used with CONSED, will also concentrate higher numbers of juvenile nematodes [*Strongyloides* spp.]. PROTO-FIX fixative, unlike 10% formalin and SAF, kills fertilized eggs of *Ascaris* spp. ELISA procedures and DFA procedures can be performed directly from fecal specimens collected and fixed in PROTO-FIX.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

PRECAUTIONS

1. PROTO-FIX is poisonous. If ingested, provide plenty of milk or water. Contact a physician or poison center immediately.
2. Avoid contact with skin and eyes. If contacted, wash thoroughly with water. Contact a physician if irritation occurs.
3. Observe all safety precautions for handling stool specimens.

STABILITY AND STORAGE

Store at room temperature (15-30°C). Avoid excessive heat and sunlight.

USER QUALITY CONTROL

PROTO-FIX fixative is a colorless, clear precipitate-free liquid. If excessive precipitation occurs, discard the fixative vial. The fixative should not be used beyond the product expiration date. The use of a positive parasite control slide for permanent staining procedures is recommended. The PROTO-FIX control slides (#0003255) contain *G. lamblia* trophozoites, ready for staining.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1. The patient should be instructed not to take antacids, oily laxatives or antidiarrheal medication unless prescribed by a physician prior

to collection of the sample(s). Radiological examination utilizing contrast chemicals (i.e. bismuth or barium) should be avoided prior to the collection of the fecal specimen for parasitic analysis, as they block the staining of ova and parasites.

2. Multiple fecal specimens are recommended to increase the predictive value of parasite recovery.
3. Fecal specimens should be passed into a dry, clean container. Do not contaminate the feces with water or urine.
4. Add enough specimen to each vial to reach the 'FILL LINE' found on the label of the vial. When present, slimy, watery or bloody portions should be collected.
5. Mix specimens well. Replace the cap and shake the vial vigorously.
6. Label the vials with appropriate patient information and return them to the laboratory. Do not freeze or incubate the specimen/fixative vials. Keep the specimen/fixative from heat.
7. After mixing thoroughly, specimen must be fixed for a minimum of one hour to assure adequate fixation of the parasitic elements.

PROCEDURE

Material Provided:

PROTO-FIX is available in various fill volumes. PROTO-FIX may be packaged alone, in a single patient vial set, or in a two-vial patient collection set (clean vial or ETM®).

Materials Not Provided:

Pasteur pipettes, centrifuge with a free-swinging head, microscope, microscope slides and coverslips, cotton-tipped applicators, reagent, and materials for staining and concentration are not provided.

Recommended Additional Reagents and Materials:

CELL-BOND® microscope slides (#0003257), CONSED (#0004628), Ethyl Acetate (#0003344), PRS™ (0004044) or PARA-PRO® *fc50* Concentration System (#0004060) are recommended.

MACROSCOPIC EXAMINATION

The fecal specimen should be examined for consistency. Record any visible irregularities such as worms, proglottids, mucus and/or blood.

DIRECT MICROSCOPIC EXAMINATION

The use of microscopic examination holds limited diagnostic value and should be limited to prescreening of specimens in the field when a centrifuge is not available. If the laboratory is going to perform the concentration procedure and/or the permanent stain, the direct microscopic examination can be eliminated.

CONCENTRATION PROCEDURES

NOTE: The CONSED Concentration Reagent is recommended as it increases the recovery of ova, helminths, and parasites. In addition, the CONSED Concentration Procedure increases the laboratory efficiencies and the diagnostic value of the permanent stain, as the permanent smear can be performed from the CONSED concentrated pellet.

1. Thoroughly mix the PROTO-FIX fixed specimen by shaking the specimen/fixative vial.
2. Add 4-5 drops of Triton X-100 to the specimen/fixative vial (up to 8 drops may be added if the specimen is highly mucoid).
3. Re-cap the fixative vial and mix the contents thoroughly by shaking for 10-20 seconds.
4. Place a PRS concentration funnel or a PARA-PRO *fc50* concentration unit (or other filtration device) into an appropriate polypropylene centrifuge tube. Remix the fixed specimen and pour the sample through the funnel into the receiver centrifuge tube
NOTE: do not force the fixed specimen solution through the funnel system.
5. Following the filtration process, retain the receiver centrifuge tube and discard the filtration unit into an appropriate disposal container.
6. Transfer 2 ml of the filtered specimen into a 15 ml centrifuge tube. To the 2 ml of the filtered PROTO-FIX fixed specimen, add 8 ml of the CONSED reagent and 4 ml of ethyl acetate (or replacement reagent) to the sample in the centrifuge tube. Replace the cap on

the tube, invert the tube, and shake vigorously for 30 seconds. Pressure will build up within the tube during shaking. To remove this pressure, loosen the cap carefully, and then retighten the cap prior to centrifugation.

7. Place the capped centrifuge tubes into the centrifuge (with a free-swinging head) and centrifuge for 10 minutes at 500 to 600 xg. Following centrifugation, four layers will develop:
 - (1) A top layer of mostly ethyl acetate
 - (2) An interface layer of fatty fecal debris
 - (3) A lower solution layer
 - (4) A pellet/sediment layer
8. Holding the centrifuge tube in a vertical position, remove the cap and free the plug of debris from the sides of the tube by ringing the tube with a wooden applicator stick. Carefully pour the top three layers into an appropriate waste container. **NOTE:** if the pellet begins to break up, place the tube in an upright position, save the pellet, and carefully aspirate any residual reagent off of the pellet with a pipette). While the tube is still tipped in the decanting position, use cotton-tipped swabs to remove remaining debris and ethyl acetate from the sides of the tube. Do not turn the tube upright until the sides of the tube have been thoroughly cleaned of the reagent solutions. If the sides are not cleaned thoroughly with the swab, lipid droplets can mix with the sediment pellet making the microscopic examination more difficult. Allowing excess ethyl acetate to run back into the pelleted sediment will result in a poor wet mount preparation due to the formation of solvent bubbles.
9. Add 3-6 drops (or an amount equal to the volume of the pellet) of PROTO-FIX. Using an applicator stick, mix thoroughly. (**NOTE:** The smear for the permanent stain and slides for special stains can be made at this point in the procedure. See the section header "Preparing Slides for Smears", and "Miscellaneous Procedures").
10. Prepare the wet mount by placing 1 drop of the pellet prepared in step #9 onto a clean glass slide. Add a drop of iodine solution (Lugol's Iodine or Dobell & O'Connor's Iodine) to the specimen, mix gently, and coverslip. Examine the slide microscopically for ova, helminths, and parasites. Consult appropriate references for the identification of ova and parasites.

FORMALIN/ETHYL ACETATE CONCENTRATION PROCEDURE

1. Thoroughly mix the PROTO-FIX fixed specimen by shaking the specimen/fixative vial.
2. Add 4-5 drops of Triton X-100 to the specimen/fixative vial. (Up to 8 drops may be added if the specimen is highly mucoid.)
3. Re-cap the fixative vial and mix the contents thoroughly by shaking for 10 to 20 seconds.
4. Place a PRS concentration funnel or a PARA-PRO *fc50* concentration unit (or other filtration device) into an appropriate polypropylene centrifuge tube. Remix the fixed specimen and pour the sample through the funnel into the receiver centrifuge tube. **NOTE:** Do not force the fixed specimen solution through the funnel system.
5. Following the filtration process, retain the receiver centrifuge tube and discard the filtration unit into an appropriate disposal container.
6. Transfer 3 ml of the filtered specimen into a 15 ml centrifuge tube. To the 3 ml of the filtered PROTO-FIX fixed specimen, add 7 ml of 10% buffered formalin and mix the specimen.
7. Add 4 ml of ethyl acetate (or replacement reagent) to the sample in the centrifuge tube. Replace the cap on the tube, invert the tube, and shake vigorously for 30 seconds. Pressure will build up within the tube during shaking. To remove this pressure, loosen the cap carefully and retighten the cap prior to centrifugation.
8. Place the capped centrifuge tubes into the centrifuge (with a free swinging head) and centrifuge for 10 minutes at 500 to 600 xg. Following centrifugation four layers will develop:
 - (1) A top layer of mostly ethyl acetate
 - (2) An interface layer of fatty fecal debris
 - (3) A lower solution layer
 - (4) A pellet/sediment layer
9. Holding the centrifuge tube in a vertical position, remove the cap, free the plug of debris from the sides of the tube by ringing the tube

with a wooden applicator stick. Carefully pour the top three layers into an appropriate waste container. **NOTE:** If the pellet begins to break up, quickly upright the tube to save the pellet and carefully aspirate any residual reagent off of the pellet with a pipette). While the tube is still tipped in the decanting position, use cotton-tipped swabs to remove remaining debris and ethyl acetate from the sides of the tube. Do not turn the tube upright until the sides of the tube have been thoroughly cleaned of the reagent solutions. If the sides are not cleaned thoroughly with the swab, lipid droplets can mix with the sediment pellet making the microscopic examination more difficult. Allowing excess ethyl acetate to run back into the pelleted sediment will result in a poor wet mount preparation due to the formation of solvent bubbles.

10. Add a few drops of PROTO-FIX to the pellet and mix well.
11. Prepare the wet mount by placing 1 drop of the sediment prepared in step #10 onto a clean glass slide. Add a drop of iodine solution (Lugol's Iodine or Dobell & O'Connor's Iodine) to the specimen, mix gently, and coverslip. Examine the slide microscopically for ova, helminths, and parasites. Consult appropriate references for the identification of ova and parasites.

PREPARING SLIDES FOR SMEARS

PROTO-FIX contains no PVA and therefore requires the use of an adhesive to improve the adhesion of the specimen to the slide during routine staining procedures. Use the following method in the slide preparation:

CELL-BOND® Slides are ready-to-use bio adhesive impregnated slides, which contain a charge, binding the specimen to the slide. Unlike slide Coating Solutions, Mayer's Albumin or PVA, CELL-BOND Slides provide not competitive staining background. This results in a clearer microscopic view of the fecal smear.

PERMANENT SMEAR PREPARATION

1. Transfer 1-2 drops of the CONSED concentrated pellet or 1-2 drops of the unconcentrated PROTO-FIX fixed specimen to a CELL-BOND slide (see above).
2. Gently and evenly spread the sample over the microscope slide. Lay or hold the slide flat with the specimen side up. Using an applicator stick, chop the specimen, spreading specimen out. This will create thick and thin areas.
3. Allow the slide to remain flat for 1 to 2 minutes. If there is still excessive liquid on the slide, stand the slide in a drying rack at 45 degrees to allow any excess liquid to drain. **NOTE:** Slides should dry for 10-15 minutes. Fecal films/smears dry at different rates. If some fecal smears are still wet after 15 minutes, they may be air-dried with a cool fan or blower. (Do not use heat to dry the fecal smear slides). Fecal films/smears can be slightly wet when staining begins. When the excess liquid stops draining (usually about 5 to 10 minutes, carefully wipe away any excess liquid on the end or edges of the slide and place the slides into a carrier for staining.

PERMANENT STAIN PROCEDURE

Modified Wheatley's Trichrome Stain Procedure

Reagent	Timing
70% Ethanol (#0003359)	1.5 minutes. Remove and drain off excess liquid by touching edge of slide to absorbent material
70% Ethanol	1.5 minutes. Remove and drain off excess liquid by touching edge of slide to absorbent material
Trichrome Stain (#0003351)* (Wheatley's)	13 minutes. Remove and drain off excess liquid by touching edge of slide to absorbent material.
90% Acid-Ethanol (#0003350)	2 seconds. Remove and drain off excess liquid by touching edge of slide to absorbent material.
100% Ethanol (#0003303)	1 minute. Remove and drain off excess liquid by touching edge of slide to absorbent material.

(Continued on next page)

Reagent	Timing
100% Ethanol (#0003359)	1 minute. Remove and drain off excess liquid by touching edge of slide to absorbent material.
Xylene (#0003342) or PRO-CLEAR™ (#0003336)	3 minutes. Remove and drain off excess liquid by touching edge of slide to absorbent material and coverslip with mounting fluid. Read under oil immersion.

NOTE: Staining time can be varied depending on the intensity desired for the final stain.

NOTE: The xylene substitute AmeriClear does not yield appropriate stain results and should not be used.

MISCELLANEOUS PROCEDURES

- Place 1 drop of the specimen onto a clean glass slide. Using an applicator stick, spread the specimen evenly to achieve a thin layer on the slide. Allow the slide to dry for 5 to 10 minutes before proceeding.
- Dip the dried smear into 70% ethanol for 1 minute.
- Remove the smear from the ethanol and gently shake off any excess ethanol. Dip the smear into distilled water about 8 times to sheet off the ethanol. Shake off the excess water and stain with the Cryptosporidium Stain (#0003357) or other appropriate stains.

DFA Staining Preparation

- Follow the smear preparation procedure listed above under **“Cryptosporidium Staining Procedure”** to prepare a slide for DFA staining.
- Follow the specific DFA manufacturer’s directions for staining the smear for DFA *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*.
- PROTO-FIX has been validated against the MERIFLUOR DFA stain for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*

Microsporidium Staining Procedure

- Follow the smear preparation procedure listed above under **“Cryptosporidium Staining Procedure”** to prepare a slide for Microsporidium staining.
- Follow the specific Microsporidium Stain manufacturer’s directions for staining the smear

Enzyme Immunoassay (EIA) Procedure

PROTO-FIX has been validated against the following manufacturers’ products for EIA testing for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*.

- ProSpecT *Cryptosporidium* Rapid Assay
- ProSpecT *Cryptosporidium* Microplate Assay
- Wampole CRYPTOSPORIDIUM TEST
- Xpect *Cryptosporidium* Kit
- ProSpecT *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. Microplate ELISA Assay
- COLORPAC *Giardia/Cryptosporidium* Rapid Test
- IMMUNOCARD stat! *Cryptosporidium/Giardia*
- Xpect *Giardia* and *Cryptosporidium* Kit
- ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* Microplate Assay
- Wampole GIARDIA TEST
- ProSpecT *Giardia* Rapid Assay
- Xpect *Giardia* Kit

EXPECTED RESULTS

Using the modified Wheatley’s Trichrome Stain procedure with organisms fixed in PROTO-FIX, the cytoplasm of trophozoites and cysts is blue-green tinged with purple. The nuclear chromatin, chromatid bodies, erythrocytes and bacteria stain purple to purplish-red. Background and artifacts stain green to purple. Helminth eggs and larvae stain red to purplish-red.

LIMITATIONS OF PROCEDURES

- The proper fixation of intestinal ova and parasites yields quality microscopic morphology and staining. Specimens not properly fixed (specimens delayed before being fixed, improper ratios of specimen to fixative, and improper mixing of the specimen into the fixative) may yield poor microscopic morphology making it difficult or impossible to properly identify the ova or parasite. False negative examinations may occur if too little specimen or if too much specimen is used in the concentration procedures.
- The Modified Wheatley’s Trichrome stain referred to in this Directions For Use is designed for use with PROTO-FIX only. All proficiency specimens received for staining (usually Zn-PVA smears) must be stained using the modified Trichrome stain designed for the zinc PVA fixative (#0003125).
- The xylene substitute AmeriClear does not yield appropriate stain results and should not be used.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

PROTO-FIX fixative, when used according to the procedures listed above, should yield quality microscopic morphologies from the wet preparation permanent stain concentration procedures.

BIBLIOGRAPHY

- Allen, K., Frankel, J.W., and Kwa, B. 1997. “Comparison of CONSED and Formalin-ethyl-Acetate Methods for Concentrating Intestinal Parasites and Eggs.” Southeastern Branch, ASM, 1997 Meeting.
- Amin, O. 2000. “Evaluation of a New System for the Fixation, Concentration and Staining of Intestinal Parasites in Fecal Specimens, with Critical Observation on the Trichrome Stain.” Journal of Microbiological Methods. 38:127-132.
- Burrows, R.B. 1965. “Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man.” Yale University Press, New Haven, CT.
- Erdman, D. 1981. “Clinical Comparison of Ethyl Acetate and Diethyl Ether in the Formalin-ether Sedimentation Technique.” J Clin. Micro. 14:483-485.
- Faust, E.C., et al. 1938. “A Critical Study of Clinical Laboratory Techniques for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces.” Am.J Trop. Hyg. Med. 18:169-183.
- Garcia, L.S., and Laurence Ash. 1979. Diagnostic Parasitology. C.V. Mosby Co., St. Louis, MO, pp. 9-24.
- Garcia, L.S., M. Voge. 1990. Diagnostic Clinical Parasitology. Am. J. Med. Technol. 46:459-467.
- Jensen, B., et al. 2000. “Comparison of Polyvinyl Alcohol Fixative with Three Less Hazardous Fixatives for the Detection and Identification of Intestinal Parasites.” J. Clin. Micro. 38(4):1592-1598.
- Markell, E., and Marietta Voge. 1981. Medical Parasitology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 317-355.
- Melvin, D.M. and M.M. Brooke, 1982. “Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites.” 3rd Edition. US Department of Health and Human Services Pub. No. (CDC) 82-8282, Atlanta, GA.
- Price, D.L. 1994. Procedure Manual for the Diagnosis of Intestinal Parasites. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Sholten, T.H. and J. Yang. 1974. “Evaluation of Unpreserved and Preserved Stools for the Detection and Identification of Intestinal Parasites.” Am. J. Clin. Pathol. 62:563-567.
- Williams, R.W. and Dennis, M. 1998. “Technical Performance of a New Fecal Fixative for *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Specimens.” ASM Meeting, Atlanta, GA.
- Young, K., S. Bullock, D. Melvin and C. Spruill. 1979. “Ethyl Acetate as a Substitute for Diethyl Ether in the Formalin-ether Sedimentation Technique.” J. Clin. Micro. 10:852-853.
- Unpublished data on file.



[+1] 800.221.6058 United States
[+1] 360.260.2779 International

Directions For Use for the following:

PROTO-FIX®

CONTACT

Alpha-Tec Systems, Inc. offers a complete line of reagents, stains, and QC1™ Quality Control Slides for AFB, Parasitology, Bacteriology, and Mycology processing, as well as O&P collection systems and concentration devices for Parasitology. For Technical Assistance, email Technical@AlphaTecSystems.com, and for Customer Service, email Sales@AlphaTecSystems.com, or call either [+1] 800.221.6058 (USA) or [+1] 360.260.2779 between 8AM and 4PM Monday through Friday, Pacific Time.

WARRANTY

This product is warranted by Alpha-Tec Systems, Inc. to perform as described in the labeling and literature supplied. Alpha-Tec Systems, Inc. disclaims any implied warranty or merchantability or fitness for any other purpose, and in no event shall Alpha-Tec Systems, Inc. be liable for any consequential damages arising out of aforesaid express warranty.

TRADEMARKS

CELL-BOND®, CONSED®, ETM®, PARA-PRO® *fc50*, PRO-CLEAR™, PROTO-FIX®, PRS™, and QC1™ are trademarks of Alpha-Tec Systems, Inc., 1311 SE Cardinal Court, Suite 170, Vancouver, WA 98683 USA.

Instrucciones de uso para los siguientes lugares:
PROTO-FIX®

APLICACIÓN

El fijador PROTO-FIX®, de Alpha-Tec Systems, Inc. está diseñado para la recolección, el transporte y la preservación de especímenes fecales para los procedimientos de tinción permanente y concentración para el diagnóstico de parásitos intestinales. El fijador PROTO-FIX es un fijador transparente e incoloro para un procesamiento vial preparaciones húmedas, manchas permanentes, las concentraciones, DFA, EIA y PCR metodologías para muestras fecales. PROTO-FIX es un alcohol de bajo, baja fijador de que la viscosidad no contiene metales pesados, PVA o colorantes anilina.

RESUMEN

Las infecciones parasitarias intestinales se diagnostican mediante la recuperación e identificación de trofozoítos y/o quistes de protozoarios, huevos de helmintos y/o nemátodos juveniles. El tratamiento se basa en la identificación positiva de especies patógenas. Dado que en ocasiones no es posible el examen inmediato de los especímenes fecales, estos deben ser preservados para su examen posterior.

El fijador PROTO-FIX es una alternativa al sistema tradicional de dos viales con fijadores metálicos de PVA y formalina. Los frotis fijados con PROTO-FIX pueden teñirse con la tinción tricrómica modificada de Wheatley. Los trofozoítos de protozoarios, quistes, huevos de helmintos y nemátodos juveniles pueden ser concentrados con los procedimientos de concentración CONSED® o FEA (formalina y acetato de etilo). El reactivo de concentración CONSED, junto con las características de desempeño de PROTO-FIX, arrojan resultados de tinción y concentración iguales o mejores que los de los métodos tradicionales (PVA y formalina al 10%) y brindan la conveniencia y ahorro de costos de un sistema de vial único. El fijador PROTO-FIX no contiene PVA, mercurio, zinc ni otros metales pesados.

El procedimiento de concentración CONSED concentra todos los estadios de los parásitos presentes en el espécimen fecal, incluyendo trofozoítos de protozoarios. Los trofozoítos son fácilmente visibles e identificables en las laminillas preparadas a partir del espécimen concentrado. Cuando se utiliza junto con CONSED, PROTO-FIX también concentrará un número mayor de nemátodos juveniles [*Strongyloides* spp.] A diferencia de la formalina al 10% y SAF, el fijador PROTO-FIX mata los huevos fertilizados de *Ascaris* spp. Es posible llevar a cabo los procedimientos ELISA y DFA directamente a partir de especímenes recolectados y fijados en PROTO-FIX.

PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO SOLAMENTE

PRECAUCIONES

1. PROTO-FIX es venenoso. En caso de ingestión, suministre abundante leche o agua. Póngase inmediatamente en contacto con un médico o un centro de intoxicación.
2. Evite el contacto con la piel u ojos. En caso de contacto, lave con abundante agua. Póngase en contacto con un médico si ocurrieran irritaciones.
3. Al manipular especímenes fecales deben observarse todas las medidas de seguridad.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Almacenar a temperatura ambiente (15 - 30°C). Evitar el exceso de calor y luz solar.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

El fijador PROTO-FIX es un líquido incoloro, transparente y libre de precipitados. Descarte el vial del fijador si hubiera precipitación excesiva. No se debe usar el fijador después de su fecha de vencimiento. Para los procedimientos de tinción permanente se recomienda la utilización de una laminilla de control positivo de

parásitos. Las laminillas de control de calidad PROTO-FIX (#0003255) contienen trofozoítos de *G. lamblia* listos para la tinción.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

1. Se debe informar al paciente que antes de la toma de la(s) muestra(s) no tome antiácidos, laxantes oleosos o medicamentos antidiarreicos salvo en caso de prescripción médica. Se deben evitar los exámenes radiológicos con químicos de contraste (ej.: bismuto o bario) antes de la recolección del espécimen fecal para análisis parasitario, dado que bloquean la tinción de los huevos y parásitos.
2. Se recomienda el uso de varios especímenes fecales para aumentar el valor de predicción de la recuperación de parásitos.
3. Los especímenes fecales deben pasarse a un recipiente seco y limpio. No se deben contaminar las heces con agua u orina.
4. Añada, a cada vial, el volumen de espécimen necesario para alcanzar la línea "FILL LINE" de la etiqueta. Si hubiera secciones viscosas, acuosas o sanguinolentas, deben recogerse.
5. Mezcle bien los especímenes. Tape el vial y agítelo vigorosamente.
6. Marque los viales con la información apropiada del paciente y devuélvalos al laboratorio. No congele o incube los viales con especímenes/fijador. Manténgalos apartados del calor.
7. El espécimen bien agitado debe fijarse por 1 hora como mínimo para asegurar la fijación adecuada de los elementos parasitarios.

PROCEDIMIENTO

Materiales incluidos:

PROTO-FIX se encuentra disponible en varios volúmenes. PROTO-FIX puede estar empaquetado de forma individual, en un conjunto de viales para un solo paciente o en un juego de recolección para pacientes de dos viales (vial limpio o ETM®).

Materiales no incluidos:

Pipetas Pasteur, centrifugadora con un cabezal libre, microscopio, laminillas y cubreobjetos para microscopio, aplicadores con extremos de algodón, reactivos y materiales de tinción y concentración.

Reactivos y materiales adicionales recomendados:

Laminillas de microscopio CELL-BOND® (#0003257), CONSED, acetato de etilo (#0003344), sistema de concentración PRS™, o PARA-PRO® *fc50*.

EXAMEN MACROSCÓPICO

Debe examinarse la consistencia del espécimen fecal. Registre cualquier irregularidad visible, como ser gusanos, proglótidos, mucus y/o sangre.

EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO

El examen microscópico tiene un valor diagnóstico limitado y debe limitarse a un examen primario de los especímenes en el campo cuando no haya centrifugadora disponible. Si el laboratorio llevará a cabo el procedimiento de concentración y/o tinción, el examen microscópico directo puede ser eliminado.

PROCEDIMIENTOS DE CONCENTRACIÓN

NOTA: A continuación se presentan dos procedimientos de concentración. Sólo es necesario realizar uno. El laboratorio puede elegir entre el procedimiento de concentración CONSED o el procedimiento de concentración de formalina/acetato de etilo. Se recomienda especialmente seleccionar el procedimiento de concentración CONSED.

PROCEDIMIENTO DE CONCENTRACIÓN CONSED

NOTA: Se recomienda el reactivo de concentración CONSED (#0004628), dado que aumenta la recuperación de huevos, helmintos y parásitos. Además, el procedimiento de concentración CONSED aumenta la eficiencia del laboratorio y el valor diagnóstico de la tinción

permanente ya que es posible realizar frotis permanentes a partir del microgránulo concentrado obtenido con CONSED.

1. Agite el espécimen/vial de fijación para mezclar bien el espécimen fijado con PROTO-FIX.
2. Agregue 4-5 gotas de Triton X-100 al espécimen/vial de fijación (se pueden añadir hasta 8 gotas si el espécimen es muy mucoso).
3. Vuelva a tapar el vial de fijación y agite bien durante 10 a 20 segundos para mezclar bien el contenido.
4. Coloque un embudo de concentración PRS™ (#0004044) o una unidad de concentración PARA-PRO *fc50* (u otro dispositivo de filtración) en un tubo de centrifugación de polipropileno adecuado. Mezcle nuevamente el espécimen fijado y vierta la muestra por el embudo hasta el tubo de centrifugación receptor. **NOTA:** No fuerce la solución del espécimen fijado a través del sistema del embudo.
5. Al terminar el proceso de filtración, conserve el tubo de centrifugación receptor y deseche la unidad de filtración en un recipiente adecuado.
6. Transfiera 2 ml del espécimen filtrado a un tubo de centrifugación de 15 ml. A los 2 ml de espécimen filtrado fijado con PROTO-FIX, agregue 8 ml del reactivo CONSED y 4 ml de acetato de etilo (o un agente sustitutivo) a la muestra del tubo de centrifugación. Tape el tubo, inviértalo y agítelo vigorosamente durante 30 segundos. Durante la agitación, se acumulará presión dentro del tubo. Para eliminar esta presión, afloje la tapa con cuidado y ajústela nuevamente antes de la centrifugación.
7. Ubique los tubos tapados en la centrifugadora (con un cabezal libre) y centrifugue durante 10 minutos a 500-600 xg. Una vez finalizada la centrifugación, observará cuatro capas:
 - (1) Una capa superior, en su mayor parte de acetato de etilo.
 - (2) Una capa intermedia de partículas fecales grasas.
 - (3) Una capa inferior de solución.
 - (4) Una capa con microgránulos/sedimentos
8. Mientras sostiene el tubo de centrifugación en posición vertical, retire la tapa y elimine el tapón de partículas de los costados del tubo pasando en círculos una varilla aplicadora de madera. Vierta cuidadosamente las tres capas superiores en un recipiente de desechos adecuado. **(NOTA:** Si el microgránulo comenzara a deshacerse, enderece rápidamente el tubo para salvarlo y con una pipeta retire con cuidado cualquier resto de reactivo de éste). Mientras el tubo está inclinado en la posición de decantación, utilice hisopos con punta de algodón para retirar las partículas y el acetato de etilo restantes de los costados del tubo. No vuelva a colocar el tubo en posición vertical hasta no haber limpiado por completo las soluciones del reactivo de los costados. Si los costados no fueran limpiados por completo con los hisopos, pequeñas gotas de lípidos podrían mezclarse con el microgránulo del sedimento lo que dificultaría el examen microscópico. Si se permitiese el retorno de un exceso de acetato de etilo al microgránulo, esto ocasionaría un preparado en fresco de mala calidad debido a la formación de burbujas de solvente.
9. Agregue 3-6 gotas (o una cantidad igual al volumen del microgránulo) de PROTO-FIX. Mezcle completamente con una varilla aplicadora. **(NOTA:** En este punto es posible preparar los frotis y laminillas para las tinciones permanentes y especiales. Consulte la sección "Preparación de laminillas para frotis" y "Procedimientos varios").
10. Para la preparación en fresco, deje caer 1 gota del microgránulo preparado en la etapa 9 sobre una laminilla de vidrio limpia. Agregue una gota de solución de yodo (solución de Lugol o solución de Dobell y O'Connor) al espécimen, mezcle con suavidad y cubra con el cubreobjetos. Examine la laminilla al microscopio en busca de huevos, helmintos y parásitos. Consulte las referencias adecuadas para la identificación de los huevos y parásitos.

PROCEDIMIENTO DE CONCENTRACIÓN EN FORMALINA/ ACETATO DE ETILO

1. Agite el espécimen/vial de fijación para mezclar bien el espécimen fijado con PROTO-FIX.

2. Agregue 4-5 gotas de Triton X-100 al espécimen/vial de fijación. (Se pueden agregar hasta 8 gotas si el espécimen es muy mucoso).
3. Vuelva a tapar el vial de fijación y agite bien durante 10 a 20 segundos para mezclar bien el contenido.
4. Coloque un embudo de concentración PRS (#0004044) o una unidad de concentración PARA-PRO *fc50* (u otro dispositivo de filtración) en un tubo de centrifugación de polipropileno adecuado. Mezcle nuevamente el espécimen fijado y vierta la muestra por el embudo hasta el tubo de centrifugación receptor. **NOTA:** No fuerce la solución del espécimen fijado a través del sistema del embudo.
5. Al terminar el proceso de filtración, conserve el tubo de centrifugación receptor y deseche la unidad de filtración en un recipiente adecuado.
6. Transfiera 3 ml del espécimen filtrado a un tubo de centrifugación de 15 ml. A los 3 ml de espécimen filtrado fijado con PROTO-FIX, agregue 7 ml de formalina diluido al 10% y mezcle el espécimen.
7. Añada 4 ml de acetato de etilo (o un agente sustituto) a la muestra del tubo de centrifugación. Tape el tubo, inviértalo y agítelo vigorosamente durante 30 segundos. Durante la agitación, se acumulará presión dentro del tubo. Para eliminar esta presión, afloje la tapa con cuidado y ajústela nuevamente antes de la centrifugación.
8. Ubique los tubos tapados en la centrifugadora (con un cabezal libre) y centrifugue durante 10 minutos a 500-600 xg. Una vez finalizada la centrifugación, observará cuatro capas:
 - (1) Una capa superior, en su mayor parte de acetato de etilo.
 - (2) Una capa intermedia de partículas fecales grasas.
 - (3) Una capa inferior de solución.
 - (4) Una capa con microgránulos/sedimentos
9. Mientras sostiene el tubo de centrifugación en posición vertical, retire la tapa y elimine el tapón de partículas de los costados del tubo pasando en círculos una varilla aplicadora de madera. Vierta cuidadosamente las tres capas superiores en un recipiente de desechos adecuado. **(NOTA:** Si el microgránulo comenzara a deshacerse, enderece rápidamente el tubo para salvarlo y con una pipeta retire con cuidado cualquier resto de reactivo de éste). Mientras el tubo está inclinado en la posición de decantación, utilice hisopos con punta de algodón para retirar las partículas y el acetato de etilo restantes de los costados del tubo. No vuelva a colocar el tubo en posición vertical hasta no haber limpiado por completo las soluciones del reactivo de los costados. Si los costados no fueran limpiados por completo con los hisopos, pequeñas gotas de lípidos podrían mezclarse con el microgránulo del sedimento lo que dificultaría el examen microscópico. Si se permitiese el retorno de un exceso de acetato de etilo al microgránulo, esto ocasionaría un preparado en fresco de mala calidad debido a la formación de burbujas de solvente.
10. Agregue unas gotas de PROTO-FIX al microgránulo y mézclelos bien.
11. Para la preparación en fresco, deje caer 1 gota del sedimento preparado en la etapa 10 sobre una laminilla de vidrio limpia. Agregue una gota de solución de yodo (solución de Lugol o solución de Dobell y O'Connor) al espécimen, mezcle con suavidad y cubra con el cubreobjetos. Examine la laminilla al microscopio en busca de huevos, helmintos y parásitos. Consulte las referencias adecuadas para la identificación de los huevos y parásitos.

PREPARACIÓN DE LAS LAMINILLAS PARA FROTIS

PROTO-FIX no contiene PVA, por lo que requiere la utilización de adhesivos para mejorar la adherencia del espécimen a la laminilla durante los procedimientos de tinción habituales. Utilice el siguiente método para la preparación de laminillas.

Las laminillas CELL-BOND (#0003257) vienen listas para usarse, impregnadas con un bioadhesivo que contiene una carga y adhiere el espécimen a la laminilla. A diferencia de la solución de revestimiento para laminillas, la albúmina de Mayer o el PVA, las laminillas CELL-

BOND no presentan un fondo con tinción competitiva, lo que provoca una visión más clara del frotis fecal al microscopio.

PREPARACIÓN DE FROTIS PERMANENTES:

Transfiera 1-2 gotas del microgránulo concentrado CONSED ó 1-2 gotas del espécimen fijado sin concentrar PROTO-FIX a una laminilla CELL-BOND (ver en las secciones anteriores).

Disperse la muestra en forma suave y homogénea sobre la laminilla. Apoye o sostenga la laminilla en posición horizontal con el espécimen en la parte superior. Con una varilla aplicadora, recorte el espécimen y dispérselo. Esto creará áreas finas y gruesas.

Deje a la laminilla en posición horizontal por 1 ó 2 minutos. Si hubiera un exceso de líquido en la laminilla, colóquela con el borde apoyado sobre una rejilla de secado, en un ángulo de 45°, para que escurra el líquido sobrante. **NOTA:** Las laminillas deben secarse durante 10-15 minutos. Las láminas/frotis fecales se secan a distintas velocidades. Si pasados los 15 minutos algunos frotis fecales continuaran húmedos, pueden secarse con un ventilador. (No utilice el calor para secar las laminillas con los frotis fecales). Las láminas o frotis fecales pueden estar levemente húmedas al comenzar la tinción. Una vez que el líquido sobrante haya dejado de escurrir (generalmente después de 5 a 10 minutos), seque con cuidado cualquier líquido que haya quedado en el extremo o en los bordes de la laminilla y póngala en una bandeja para tinción.

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN PERMANENTE

Procedimiento de tinción tricrómica modificado de Wheatley

Reactivo	Tiempo
Etanol al 70% (#0003359)	1,5 minutos. Elimine el exceso de líquido al colocar el borde de la laminilla en contacto con un material absorbente.
Etanol al 70 %	1,5 minutos. Elimine el exceso de líquido al colocar el borde de la laminilla en contacto con un material absorbente.
Colorante tricrómico (#0003351)* (tinción de Wheatley)	13 minutos. Elimine el exceso de líquido al colocar el borde de la laminilla en contacto con un material absorbente.
Etanol-ácido al 90% (#0003350)	5 segundos. Elimine el exceso de líquido al colocar el borde de la laminilla en contacto con un material absorbente.
Etanol al 100% (#0003303)	10 segundos. Elimine el exceso de líquido al colocar el borde de la laminilla en contacto con un material absorbente.
Etanol al 100%	1 minuto. Elimine el exceso de líquido al colocar el borde de la laminilla en contacto con un material absorbente.
Etanol al 100%	1 minuto. Elimine el exceso de líquido al colocar el borde de la laminilla en contacto con un material absorbente.
Xileno (#0003342) o PRO-CLEAR™ (#0003336)	3 minutos. Elimine el exceso de líquido al colocar el borde de la laminilla en contacto con un material absorbente y el cubreobjetos con el líquido de montaje. Realice la observación bajo un objetivo de inmersión en aceite.

NOTA: El sustituto del xileno AmeriClear no produce resultados adecuados de tinción, por lo que no debe ser empleado.

***NOTA:** El tiempo de tinción puede variar de acuerdo con la intensidad que se desea para la tinción final.

PROCEDIMIENTOS VARIOS

Procedimiento de tinción para Cryptosporidium

1. Deposite una gota del espécimen sobre una laminilla de vidrio limpia. Con una varilla aplicadora, disperse el espécimen en forma homogénea para lograr una capa delgada sobre la laminilla. Deje secar la laminilla durante 5 a 10 minutos antes de continuar.
2. Sumerja el frotis seco en etanol al 70% por 1 minuto.

3. Retire el frotis del etanol y sacúdalo con suavidad para eliminar el exceso de etanol. Sumerja el frotis en agua destilada unas 8 veces para terminar de retirar el etanol. Sacuda la laminilla para eliminar el exceso de agua y realice la tinción con el equipo de tinción Cryptosporidium (#0003357) u otros colorantes adecuados.

Preparación para la tinción con DFA

1. Siga el procedimiento de preparación del frotis descrito en la sección **"Procedimiento de tinción para Cryptosporidium"** para preparar una laminilla para tinción con DFA.
2. Siga las instrucciones del fabricante de DFA para la tinción del frotis con DFA para *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.
3. Se ha confirmado la validez de PROTO-FIX con respecto al colorante MERIFLUOR DFA para *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.

Procedimiento de tinción para Microsporidium

1. Siga el procedimiento de preparación del frotis descrito en la sección **"Procedimiento de tinción para Cryptosporidium"** para preparar una laminilla para tinción con Microsporidium.
2. Para la tinción del frotis siga las instrucciones del fabricante del colorante específico para Microsporidium.

Procedimiento de inmunoensayo enzimático (EIA)

Se ha confirmado la validez de PROTO-FIX con respecto a los productos de los siguientes fabricantes de productos para ensayo EIA para *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.

1. Ensayo rápido para *Cryptosporidium* ProSpecT
2. Ensayo en microplaca para *Cryptosporidium* ProSpecT
3. PRUEBA PARA CRYPTOSPORIDIUM Wampole
4. Kit para *Cryptosporidium Xpect*
5. Ensayo en microplaca ELISA para *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* ProSpecT
6. Prueba rápida para *Giardia/Cryptosporidium* ColorPAC
7. Prueba para *Cryptosporidium/Giardia* ImmunoCard STAT!
8. Kit para *Giardia* y *Cryptosporidium Xpect*
9. Ensayo en microplaca para *Giardia/Cryptosporidium* ProSpecT
10. PRUEBA PARA GIARDIA Wampole
11. Ensayo rápido para *Giardia* ProSpecT
12. Kit para *Giardia Xpect*

RESULTADOS ESPERADOS

Al emplear el procedimiento de tinción tricrómica modificado de Wheatley con organismos fijados en PROTO-FIX, el citoplasma de los trofozoitos y quistes aparece de color verde azulado matizado con púrpura. La cromatina nuclear, los cuerpos cromatoides, eritrocitos y las bacterias se tiñen de color púrpura a rojo púrpura. Los artefactos y el fondo se tiñen de color verde a púrpura. Los huevos de los helmintos y las larvas se tiñen de color rojo o rojo púrpura.

LIMITACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS

1. La fijación correcta de los huevos y parásitos intestinales brinda una tinción y morfología microscópica de calidad. Los especímenes que no hayan sido fijados adecuadamente [especímenes cuya fijación se haya visto demorada, relación espécimen: fijador incorrecta, mezcla incorrecta del espécimen con el fijador] pueden dar lugar a una mala morfología microscópica, que dificulte o imposibilite la correcta identificación de los huevos o parásitos. Pueden haber falsos negativos si se utiliza muy poco o demasiado espécimen en los procedimientos de concentración.
2. La tinción tricrómica de Wheatley que se menciona en estas instrucciones de uso ha sido diseñada para ser usada únicamente con el PROTO-FIX. Todos los especímenes de competencia recibidos para tinción (generalmente frotis de zinc-PVA) deben teñirse con el colorante tricrómico modificado diseñado para el fijador zinc-PVA (#0003125).
3. El sustituto del xileno AmeriClear no produce resultados adecuados de tinción, por lo que no debe ser empleado.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

Cuando el fijador PROTO-FIX se emplea de acuerdo con los procedimientos arriba enumerados debería producir morfologías microscópicas de calidad a partir de los procedimientos de preparado húmedo y concentración de tinción permanente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen, K., Frankel, J.W., and Kwa, B. 1997. "Comparison of CONSED Red and Formalin-ethyl-Acetate Methods for Concentrating Intestinal Parasites and Eggs." Southeastern Branch, ASM, 1997 Meeting.
2. Amin, O. 2000. "Evaluation of a New System for the Fixation, Concentration and Staining of Intestinal Parasites in Fecal Specimens, with Critical Observations on the Trichrome Stain." *Journal of Microbiological Methods*. 38:127-132.
3. Burrows, R.B. 1965. "Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man." Yale University Press, New Haven, CT.
4. Erdman, D. 1981. "Clinical Comparison of Ethyl Acetate and Diethyl Ether in the Formalin-ether Sedimentation Technique." *J Clin. Micro*. 14:483-485.
5. Faust, E.C., et al. 1938. "A Critical Study of Clinical Laboratory Techniques for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces." *Am. J Trop. Hyg. Med*. 18:169-183.
6. Garcia, L.S., and Lawrence Ash. 1979. *Diagnostic Parasitology*. C.V. Mosby Co., St. Louis, MO, pp. 9-24.
7. Garcia, L.S., M. Voge. 1990. *Diagnostic Clinical Parasitology*. *Am. J. Med. Technol*. 46:459-467.
8. Jensen, B., et al. 2000. "Comparison of Polyvinyl Alcohol Fixative with Three Less Hazardous Fixatives for the Detection and Identification of Intestinal Parasites." *J. Clin. Micro*. 38(4):1592-1598.
9. Markell, E., and Marietta Voge. 1981. *Medical Parasitology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 317-355.
10. Melvin, D.M. and M.M. Brooke, 1982. "Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites." 3rd Edition. US Department of Health and Human Services Pub. No. (CDC) 82-8282, Atlanta, GA.
11. Price, D.L. 1994. *Procedure Manual for the Diagnosis of Intestinal Parasites*. CRC Press, Boca Raton, FL.
12. Sholten, T.H. and J. Yang. 1974. "Evaluation of Unpreserved and Preserved Stools for the Detection and Identification of Intestinal Parasites." *Am. J. Clin. Pathol*. 62:563-567.
13. Williams, R.W. and Dennis, M. 1998. "Technical Performance of a New Fecal Fixative for *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Specimens." ASM Meeting, Atlanta, GA.
14. Young, K., S. Bullock, D. Melvin and C. Spruill. 1979. "Ethyl Acetate as a Substitute for Diethyl Ether in the Formalin-ether Sedimentation Technique." *J. Clin. Micro*. 10:852-853.
15. Unpublished data on file.

CONTACTO

Para asistencia técnica o atención al cliente, envíe un correo electrónico a Sales@AlphaTecSystems.com o llame al [+1] 800.221.6058 desde los Estados Unidos, o al [+1] 360.260.2779 en Washington, de lunes a viernes, de 8 de la mañana a 4 de la tarde, hora del Pacífico.

GARANTÍA

Alpha-Tec Systems, Inc. garantiza que este producto se desempeñará según la descripción de la etiqueta y la literatura incluida. Alpha-Tec Systems, Inc. renuncia a cualquier garantía implícita de comerciabilidad o adecuación para cualquier otro fin y, en ninguna circunstancia Alpha-Tec Systems, Inc. será responsable de cualquier daño que pudiera surgir como consecuencia de la garantía expresa antes mencionada.

MARCAS REGISTRADAS:

CELL-BOND®, CONSED®, ETM®, PARA-PRO® *fc50*, PRO-CLEAR™, PROTO-FIX®, PRS™, and QC1™ son marcas registradas de Alpha-Tec Systems, Inc., 1311 SE Cardinal Court, Suite 170, Vancouver, WA 98683 USA.

Indicazioni per l'uso di:
PROTO-FIX®

USO PREVISTO

PROTO-FIX® di Alpha-Tec Systems, Inc. è un sistema di fissazione progettato per la raccolta, il trasporto e la conservazione di campioni fecali per la colorazione permanente e le procedure di concentrazione al fine di diagnosticare la presenza di parassiti intestinali. PROTO-FIX fissativo è un chiaro, incolore fissativo di elaborazione un flaconcino per preparazioni a fresco, macchie permanenti, concentrazioni, DFA, VIA e PCR metodologie di campioni fecali. PROTO-FIX è un alcool basso, basso viscosità fissativo che non contiene metalli pesanti, PVA o anilina coloranti.

SOMMARIO

Le infezioni intestinali parassitarie sono diagnosticate attraverso il recupero e l'identificazione di protozoi trofozoiti e /o cisti o uova di elminti e/o stadi giovanili di nematodi. Il trattamento si basa sull'identificazione di specie patogeni. Le circostanze spesso non permettono l'esame immediato dei campioni fecali, il campione deve quindi essere conservato per un esame successivo.

Il fissativo PROTO-FIX è un'alternativa al metodo tradizionale a due fiale con PVA e formalina. I vetrini dei campioni fissati con PROTO-FIX possono essere colorati utilizzando la colorazione tricromica di Wheatley modificata. I protozoi trofozoiti, le cisti, le uova di elminti e gli stadi giovanili dei nematodi possono essere concentrati tramite le procedure di concentrazione CONSED® o FEA [formalina etilacetato]. Il reagente per la concentrazione CONSED insieme alle caratteristiche di performance di PROTO-FIX garantiscono risultati di concentrazione e colorazione paritari o migliori rispetto alle metodologie convenzionali (PVA e formalina al 10%) e offrono convenienza e risparmio con un sistema a fiala unica. PROTO-FIX fissativo ha PVA, mercurio, zinco o altri metalli pesanti.

La procedura di concentrazione CONSED concentra tutti gli stadi di tutti i trofozoiti presenti nel campione fecale, inclusi i protozoi trofozoiti. I trofozoiti risultano chiaramente visibili e identificabili sui vetrini preparati dal campione concentrato. PROTO-FIX, se usato con CONSED, può concentrare un numero maggiore di nematodi agli stadi giovanili [*Strongyloides* spp.]. A differenza della formalina al 10% e del SAF, il fissativo PROTO-FIX uccide le uova fecondate di *Ascaris* spp. Dai campioni fecali raccolti e fissati in PROTO-FIX possono essere eseguite direttamente procedure ELISA e DFA.

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

PRECAUZIONI

1. PROTO-FIX è velenoso. Se ingerito, bere latte o acqua in abbondanza. Contattare immediatamente un medico o un centro anti veleni.
2. Evitare il contatto con pelle e occhi. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua. Rivolgersi a un medico in caso di irritazione.
3. Osservare tutte le misure di sicurezza per la gestione di campioni fecali.

STABILITA' E CONSERVAZIONE

Conservare a temperatura ambiente (15-30°C). Evitare temperature troppo alte e l'esposizione alla luce del sole.

CONTROLLO QUALITA' UTENTE

Il fissativo PROTO-FIX è incolore, nitido, liquido e privo di precipitati. In caso di eccessive precipitazioni, eliminare la fiala di fissativo. Non utilizzare il fissativo oltre la data di scadenza del prodotto. Per le procedure di colorazione permanente si raccomanda l'uso di un vetrino di controllo positivo per parassiti. I vetrini di Controllo Qualità per

PROTO-FIX (#0003255) contengono trofozoiti *G. lamblia* e sono pronti per la colorazione.

RACCOLTA & PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Avvertire il paziente di non assumere antiacidi, lassativi oleosi o medicinali antidiarroidici, a meno di una prescrizione medica, prima della raccolta del campione (campioni). Prima della raccolta del campione fecale per analisi parassitologiche evitare esami radiologici che prevedono l'utilizzo di prodotti chimici di contrasto (es. bario o bismuto), che inibiscono la colorazione di uova e parassiti.
2. Si raccomanda la raccolta di più di un campione fecale per aumentare il valore predittivo del recupero dei parassiti.
3. Raccogliere i campioni fecali in un contenitore pulito e asciutto. Non contaminare le feci con acqua o urina.
4. Inserire un quantitativo sufficiente di campione in ogni fiala in modo da raggiungere la linea di riempimento "FILL LINE" presente sull'etichetta della fiala. Raccogliere, se presenti, porzioni mucose, acquose o con presenza di sangue.
5. Miscelare bene i campioni. Chiudere e agitare vigorosamente la fiala.
6. Etichettare le fiale con le informazioni sul paziente e riportarle al laboratorio. Non congelare o incubare il campione nelle fiale con fissativo. Tenere il campione nelle fiale con fissativo lontano da fonti di calore.
7. Per garantire un'adeguata fissazione degli elementi parassitari, il campione ben miscelato deve essere fissato per almeno un'ora.

PROCEDURA

Materiali forniti:

PROTO-FIX è disponibile in diversi volumi di riempimento. PROTO-FIX può essere confezionato da solo, oppure nel set per il paziente, in fiala unica o in due fiale (provetta vuota o ETM®).

Materiali non forniti:

Pipette pasteur, centrifuga con rotore ad oscillazione libera, microscopio, vetrini e coprioggetto per microscopio, applicatori con un'estremità di cotone, reagenti e materiali per la colorazione e per la concentrazione.

Reagenti & materiali aggiuntivi raccomandati:

Vetrini per microscopio CELL-BOND® (#0003257), CONSED, etil acetato (#0003344), sistema di concentrazione PRS™, o PARA-PRO® fc-50.

ESAME MACROSCOPICO

Il campione fecale deve essere esaminato per la consistenza. Registrare eventuali irregolarità come presenza di vermi, proglottidi, muco e/o sangue.

ESAME MICROSCOPICO DIRETTO

L'esame microscopico diretto ha valore diagnostico limitato e dovrebbe essere effettuato solo su campioni preselezionati quando non è disponibile una centrifuga. Se il laboratorio può eseguire una procedura di concentrazione e/o una colorazione permanente, l'esame microscopico diretto può non essere effettuato.

PROCEDURE DI CONCENTRAZIONE

NOTA: Di seguito sono descritte due procedure di concentrazione. Effettuare solo una procedura di concentrazione. Il laboratorio può utilizzare la procedura di concentrazione CONSED o la procedura di concentrazione Formalina / etilacetato. E' altamente raccomandata la procedura di concentrazione CONSED.

PROCEDURA DI CONCENTRAZIONE CONSED

NOTA: E' consigliato l'uso del reagente di concentrazione CONSED (#046-28) in quanto aumenta il recupero di uova, elminti e parassiti. Inoltre, la procedura di concentrazione CONSED aumenta l'efficienza del laboratorio e il valore diagnostico della colorazione permanente, in quanto dal pellet concentrato con CONSED può essere allestito il preparato permanente.

- Miscelare accuratamente il campione fissato con PROTO-FIX agitando il campione nella fiala con il fissativo.
- Aggiungere 4-5 gocce di Triton X-100 al campione nella fiala con fissativo (se il campione è fortemente mucoso possono essere aggiunte fino a 8 gocce).
- Richiudere la fiala con fissativo e miscelare accuratamente il contenuto agitando per 10-20 secondi.
- Inserire l'unità di concentrazione PRS (#0004044) o PARA-PRO *fc-50* (o altri dispositivi di filtrazione) nell'apposita provetta da centrifuga in polipropilene. Rimescolare il campione fissato e far scivolare il campione attraverso il filtro nella provetta da centrifuga ricevente. **NOTA:** Non forzare il passaggio della soluzione del campione fissato attraverso il sistema di filtrazione.
- A filtrazione eseguita, mantenere la provetta da centrifuga ricevente ed eliminare l'unità di filtrazione in un contenitore adatto allo smaltimento.
- Trasferire 2 ml del campione filtrato in una provetta da centrifuga da 15 ml. Aggiungere ai 2 ml di campione fissato in PROTO-FIX e filtrato nella provetta da centrifuga, 8 ml del reagente CONSED e 4 ml di etilacetato (o un reagente analogo). Chiudere la provetta, invertire e agitare vigorosamente per 30 secondi. Durante l'agitazione aumenterà la pressione all'interno della provetta. Per eliminare questa pressione, allentare con delicatezza il tappo; riavvitare poi il tappo prima di centrifugare.
- Posizionare la provetta ben chiusa nella centrifuga (con rotore a oscillazione libera) e centrifugare per 10 minuti a 500-600 xg. A seguito della centrifugazione si svilupperanno 4 strati:
 - Uno strato superiore formato per lo più da etilacetato
 - Un secondo strato di residui fecali
 - Uno strato inferiore formato dalla soluzione
 - Un pellet di sedimenti
- Tenendo la provetta in posizione verticale, togliere il tappo, eliminare i sedimenti dalle pareti della provetta tramite un bastoncino applicatore di legno. Versare con delicatezza i primi tre strati in un contenitore appropriato per lo smaltimento. (**NOTA:** se il pellet comincia a rompersi, riportare velocemente la provetta in posizione verticale per non perdere il pellet e aspirare con attenzione ogni reagente residuo al di fuori del pellet con una pipetta). Mentre la provetta è ancora inclinata, usare un tampone con l'estremità di cotone per rimuovere i residui rimanenti e l'etilacetato dalle pareti della provetta. Non ruotare la provetta in posizione verticale fino a che le pareti della provetta non sono state completamente pulite dalle soluzioni dei reagenti. Se le pareti non vengono pulite a fondo con il tampone, gocce lipidiche potrebbero mescolarsi con il sedimento rendendo più difficile l'esame microscopico. Se l'eccesso di etilacetato dovesse tornare a contatto con il pellet di sedimenti, la formazione di bolle di solvente potrebbe risultare in un preparato per il vetrino molto scarso.
- Aggiungere 3-6 gocce (o un quantitativo pari al volume del pellet) di PROTO-FIX. Mescolare accuratamente con un bastoncino applicatore. (**NOTA:** I vetrini per la colorazione permanente e i vetrini per le colorazioni speciali possono essere preparati in questo momento della procedura. Riferirsi ai paragrafi intitolati: "Preparazione dei vetrini" e "Procedure varie".)
- Preparare la sospensione ponendo una goccia del sedimento ottenuto dal passaggio #9 su un vetrino pulito. Aggiungere al campione una goccia di soluzione di iodio (Lugol's Iodine o Dobell & O'Connor's Iodine), miscelare con cautela e applicare il coprioggetto. Esaminare il vetrino al microscopio per uova, elminti e parassiti. Consultare i riferimenti appropriati per l'identificazione di uova e parassiti.
- Inserire l'unità di concentrazione PRS (#0004044) o PARA-PRO *fc50* (o altri dispositivi di filtrazione) nell'apposita provetta da centrifuga in polipropilene. Rimescolare il campione fissato e far scivolare il campione attraverso il filtro nella provetta da centrifuga ricevente. **NOTA:** Non forzare il passaggio della soluzione del campione fissato attraverso il sistema di filtrazione.
- A filtrazione eseguita, mantenere la provetta da centrifuga ricevente ed eliminare l'unità di filtrazione in un contenitore adatto allo smaltimento.
- Trasferire 3 ml del campione filtrato in una provetta da centrifuga da 15 ml. Aggiungere ai 3 ml di campione fissato in PROTO-FIX e filtrato, 7 ml di formalina tamponata 10% e miscelare il campione.
- Aggiungere 4 ml di etilacetato (o un reagente analogo) al campione nella provetta da centrifuga. Chiudere la provetta, invertire e agitare vigorosamente per 30 secondi. Durante l'agitazione aumenterà la pressione all'interno della provetta. Per eliminare questa pressione, allentare con delicatezza il tappo; riavvitare poi il tappo prima di centrifugare.
- Posizionare la provetta ben chiusa nella centrifuga (con rotore a oscillazione libera) e centrifugare per 10 minuti a 500-600 xg. A seguito della centrifugazione si svilupperanno 4 strati:
 - Uno strato superiore formato per lo più da etilacetato
 - Un secondo strato di residui fecali
 - Uno strato inferiore formato dalla soluzione
 - Un pellet di sedimenti
- Tenendo la provetta in posizione verticale, togliere il tappo, eliminare i sedimenti dalle pareti della provetta tramite un bastoncino applicatore di legno. Versare con delicatezza i primi tre strati in un contenitore appropriato per lo smaltimento. (**NOTA:** se il pellet comincia a rompersi, riportare velocemente la provetta in posizione verticale per non perdere il pellet e aspirare con attenzione ogni reagente residuo al di fuori del pellet con una pipetta). Mentre la provetta è ancora inclinata, usare un tampone con l'estremità di cotone per rimuovere i residui rimanenti e l'etilacetato dalle pareti della provetta. Non ruotare la provetta in posizione verticale fino a che le pareti della provetta non sono state completamente pulite dalle soluzioni dei reagenti. Se le pareti non vengono pulite a fondo con il tampone, gocce lipidiche potrebbero mescolarsi con il sedimento rendendo più difficile l'esame microscopico. Se l'eccesso di etilacetato dovesse tornare a contatto con il pellet di sedimenti, la formazione di bolle di solvente potrebbe risultare in un preparato per il vetrino molto scarso.
- Aggiungere poche gocce di PROTO-FIX al pellet e miscelare bene.
- Preparare la sospensione ponendo una goccia del sedimento ottenuto dal passaggio #10 su un vetrino pulito. Aggiungere al campione una goccia di soluzione di iodio (Lugol's Iodine o Dobell & O'Connor's Iodine), miscelare con cautela e applicare il coprioggetto. Esaminare il vetrino al microscopio per uova, elminti e parassiti. Consultare i riferimenti appropriati per l'identificazione di uova e parassiti.

PROCEDURA DI CONCENTRAZIONE FORMALINA / ETILACETATO

- Miscelare accuratamente il campione fissato con PROTO-FIX agitando il campione nella fiala con il fissativo.
- Aggiungere 4-5 gocce di Triton X-100 al campione nella fiala con fissativo (se il campione è fortemente mucoso possono essere aggiunte fino a 8 gocce).
- Richiudere la fiala con fissativo e miscelare accuratamente il contenuto agitando per 10-20 secondi.

PREPARAZIONE DEI VETRINI

PROTO-FIX non contiene PVA e quindi, per migliorare l'adesione del campione al vetrino per la procedura di colorazione, è necessario l'utilizzo di un adesivo. Seguire il metodo seguente per la preparazione del vetrino:

I vetrini CELL-BOND (#0003257) sono vetrini pronti all'uso impregnati con un bio-adesivo che contiene una carica positiva che attrae il preparato al vetrino. Con i vetrini CELL-BOND non rimane la colorazione di fondo che si forma invece utilizzando normali vetrini con film adesivo come Albumina di Mayer o PVA. Ciò si traduce in una visione microscopica più chiara dello striscio fecale.

ALLESTIMENTO DEL PREPARATO PERMANENTE:

- Trasferire 1-2 gocce di sedimento concentrato con CONSED o 1-2 gocce di campione fissato con PROTO-FIX ma non concentrato, su un vetrino CELL-BOND slide (vedi sopra).
- Con cautela, spargere in modo uniforme il campione sul vetrino per microscopio. Lasciare o tenere il vetrino in posizione orizzontale

con il campione verso l'alto. Con un applicatore a stick, distendere il campione sul vetrino creando aree di diverso spessore.

3. Lasciare il vetrino in posizione orizzontale per 1-2 minuti. Se rimane del liquido in eccesso sul vetrino, inclinare il vetrino a 45 gradi in un rack per far scivolare il liquido in eccesso. **NOTA:** Lasciar asciugare i vetrini per 10-15 minuti. Asciugatura a diverse velocità degli strisci fecali. Se alcuni strisci fecali sono ancora bagnati dopo 15 minuti, possono essere asciugati usando l'aria fresca proveniente da un ventilatore. (Non utilizzare il calore per asciugare i vetrini con i preparati fecali). Lo striscio fecale può essere leggermente umido prima dell'inizio della colorazione. Quando si arresta la perdita del liquido in eccesso (solitamente dopo circa 5-10 minuti), asciugare delicatamente il liquido in eccesso sui bordi del vetrino e porre il vetrino in un contenitore per la colorazione.

PROCEDURA DI COLORAZIONE PERMANENTE

Procedura di colorazione tricromica di Wheatley modificata

Reagente	Tempo
Etanolo 70% (#0003359)	1.5 minuti. Rimuovere e assorbire l'eccesso di liquido toccando il bordo del vetrino con materiale assorbente.
Etanolo 70%	1.5 minuti. Rimuovere e assorbire l'eccesso di liquido toccando il bordo del vetrino con materiale assorbente.
Colorante Wheatley Trichrome (#0003351)*	13 minuti. Rimuovere e assorbire l'eccesso di liquido toccando il bordo del vetrino con materiale assorbente.
Etanolo acido 90% (#0003350)	5 secondi. Rimuovere e assorbire l'eccesso di liquido toccando il bordo del vetrino con materiale assorbente.
Etanolo 100% (#0003303)	10 secondi. Rimuovere e assorbire l'eccesso di liquido toccando il bordo del vetrino con materiale assorbente.
Etanolo 100%	1 minuto. Rimuovere e assorbire l'eccesso di liquido toccando il bordo del vetrino con materiale assorbente.
Etanolo 100%	1 minuto. Rimuovere e assorbire l'eccesso di liquido toccando il bordo del vetrino con materiale assorbente.
Xilene (#0003342) o PRO-CLEAR™ (#0003336)	3 minuti. Rimuovere e assorbire l'eccesso di liquido toccando il bordo del vetrino con materiale assorbente, coprire con liquido di montaggio. Leggere dopo immersione ad olio.

NOTA: Il sostituto dello xilene: AmeriClear non produce risultati adeguati di colorazione, pertanto non deve essere utilizzato.

* **NOTA:** Il tempo di colorazione può variare a seconda dell'intensità di colorazione finale desiderata.

PROCEDURE VARIE

Procedura di colorazione del *Cryptosporidium*

1. Applicare una goccia del campione su un vetrino pulito. Con un applicatore a stick diffondere il campione sul vetrino in modo da ottenere uno strato sottile. Lasciar asciugare il vetrino per 5-10 minuti prima di procedere.
2. Immergere il vetrino asciutto in etanolo 70% per 1 minuto.
3. Rimuovere il vetrino dall'etanolo e scuoterlo delicatamente eliminando l'eccesso di etanolo. Immergere il vetrino in acqua distillata circa 8 volte per eliminare completamente l'etanolo. Scuotere il vetrino per eliminare l'eccesso di acqua e colorare con il set di colorazione per *Cryptosporidium* (#0003357) o altri coloranti appropriati.

Preparazione per la colorazione DFA

1. Seguire la procedura di preparazione sopra descritta nel paragrafo "Procedura di colorazione del *Cryptosporidium*" per preparare il vetrino per la colorazione DFA.
2. Seguire le istruzioni specifiche del produttore del DFA per colorare il vetrino per DFA *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*
3. PROTO-FIX è stato validato con MERIFLUOR® DFA stain per *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*.

Procedura di colorazione del Microsporidium

Seguire la procedura di preparazione sopra descritta nel paragrafo "Procedura di colorazione del *Cryptosporidium*" per preparare il vetrino per la colorazione del Microsporidium. Seguire le istruzioni specifiche del produttore del colorante per il Microsporidium per colorare il vetrino.

Procedura Enzyme Immunoassay (EIA)

PROTO-FIX è stato validato con i seguenti prodotti per test in EIA per *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*.

1. ProSpecT *Cryptosporidium* Rapid Assay
2. ProSpecT *Cryptosporidium* Microplate Assay
3. Wampole CRYPTOSPORIDIUM TEST
4. Xpect *Cryptosporidium* Kit
5. ProSpecT *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. Microplate ELISA Assay
6. ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* Rapid Test
7. ImmunoCard STAT! *Cryptosporidium/Giardia*
8. Xpect *Giardia* and *Cryptosporidium* Kit
9. ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* Microplate Assay
10. Wampole GIARDIA TEST
11. ProSpecT *Giardia* Rapid Assay
12. Xpect *Giardia* Kit

RISULTATI PREVISTI

Utilizzando la procedura di colorazione tricromica di Wheatley modificata con gli organismi fissati in PROTO-FIX, il citoplasma dei trofozoiti e le cisti risultano blu-verdi con sfumature di viola. La cromatina nucleare, i corpi cromatoidi, gli eritrociti e i batteri si colorano da viola a rosso-porpora. Il fondo e gli artefatti si colorano da verde a viola. Le uova di elminti e le larve si colorano da rosso a rosso-porpora.

LIMITAZIONI DELLE PROCEDURE

1. La corretta fissazione di uova e parassiti intestinali garantisce una morfologia microscopica e una colorazione di qualità. Campioni fissati in maniera non corretta [fissazione dei campioni ritardata rispetto alla raccolta, quantitativi impropri del campione rispetto al fissativo e miscelazione non corretta del campione nel fissativo] possono causare una scarsa morfologia microscopica che rende difficile o impossibile l'identificazione corretta di uova o parassiti. Possono verificarsi falsi negativi se nelle procedure di concentrazione viene utilizzato un quantitativo di campione scarso o eccessivo.
2. La colorazione tricromica di Wheatley's modificata, presente in queste Istruzioni per l'uso, è progettata solo per l'uso di PROTO-FIX. Tutti gli altri campioni (in genere vetrini in Zn-PVA) devono essere colorati usando la colorazione tricromica modificata per fissativi con zinco e PVA (#0003125).
3. Il sostituto dello xilene: AmeriClear non produce risultati adeguati di colorazione, pertanto non deve essere utilizzato.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DI PERFORMANCE

Il fissativo PROTO-FIX se utilizzato secondo le procedure sopra elencate, è in grado di produrre morfologie microscopiche di qualità a partire da preparati per vetrini, procedure di concentrazione per colorazione permanente.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen, K., Frankel, J.W., and Kwa, B. 1997. "Comparison of CONSED Red and Formalin-ethyl-Acetate Methods for Concentrating Intestinal Parasites and Eggs." Southeastern Branch, ASM, 1997 Meeting.
2. Amin, O. 2000. "Evaluation of a New System for the Fixation, Concentration and Staining of Intestinal Parasites in Fecal Specimens, with Critical Observations on the Trichrome Stain." *Journal of Microbiological Methods*. 38:127-132.
3. Burrows, R.B. 1965. "Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man." Yale University Press, New Haven, CT.
4. Erdman, D. 1981. "Clinical Comparison of Ethyl Acetate and Diethyl Ether in the Formalin-ether Sedimentation Technique." *J Clin. Micro*. 14:483-485.
5. Faust, E.C., et al. 1938. "A Critical Study of Clinical Laboratory Techniques for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces." *Am. J Trop. Hyg. Med*. 18:169-183.
6. Garcia, L.S., and Lawrence Ash. 1979. *Diagnostic Parasitology*. C.V. Mosby Co., St. Louis, MO, pp. 9-24.
7. Garcia, L.S., M. Voge. 1990. *Diagnostic Clinical Parasitology*. *Am. J. Med. Technol*. 46:459-467.
8. Jensen, B., et al. 2000. "Comparison of Polyvinyl Alcohol Fixative with Three Less Hazardous Fixatives for the Detection and Identification of Intestinal Parasites." *J. Clin. Micro*. 38(4):1592-1598.
9. Markell, E., and Marietta Voge. 1981. *Medical Parasitology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 317-355.
10. Melvin, D.M. and M.M. Brooke, 1982. "Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites." 3rd Edition. US Department of Health and Human Services Pub. No. (CDC) 82-8282, Atlanta, GA.
11. Price, D.L. 1994. *Procedure Manual for the Diagnosis of Intestinal Parasites*. CRC Press, Boca Raton, FL.
12. Sholten, T.H. and J. Yang. 1974. "Evaluation of Unpreserved and Preserved Stools for the Detection and Identification of Intestinal Parasites." *Am. J. Clin. Pathol*. 62:563-567.
13. Williams, R.W. and Dennis, M. 1998. "Technical Performance of a New Fecal Fixative for *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Specimens." ASM Meeting, Atlanta, GA.
14. Young, K., S. Bullock, D. Melvin and C. Spruill. 1979. "Ethyl Acetate as a Substitute for Diethyl Ether in the Formalin-ether Sedimentation Technique." *J. Clin. Micro*. 10:852-853.
15. Unpublished data on file.

CONTATTI

Per contattare l'assistenza tecnica o il servizio clienti, inviare un messaggio e-mail all'indirizzo Sales@AlphaTecSystems.com oppure chiamare il numero [+1] 800.221.6058 o il numero [+1] 360.260.2779 tra le 8 e le 16 dal lunedì al venerdì, ora del Pacifico.

Riferimenti distributore: 'Arnika srl Diagnostic Line – tel. 02.26880211 – fax 02.26880299 – info@arnika.net

GARANZIA

Alpha-Tec Systems, Inc. garantisce la conformità delle prestazioni di questo prodotto a quanto descritto nelle etichette e nella documentazione fornita. Alpha-Tec Systems, Inc. declina ogni garanzia implicita, nonché di commerciabilità o idoneità a un determinato scopo, e in nessun caso Alpha-Tec Systems, Inc. sarà responsabile di danni consequenziali o incidentali non contemplati dalla suddetta garanzia esplicita.

MARCHI:

CELL-BOND®, CONSED®, ETM®, PARA-PRO® *fc50*, PRO-CLEAR™, PROTO-FIX®, PRS™, and QC1™ sono marchi di Alpha-Tec Systems, Inc., 1311 SE Cardinal Court, Suite 170, Vancouver, WA 98683 USA.

PRODUCT CODES

- 0004600 PROTO-FIX, 50/Box
- 0004602 PROTO-FIX, 50 Sets/Box
- 0004603 PROTO-FIX/ETM, 50/Box
- 0004604 PROTO-FIX/Clean Vial, 25 Sets/Box
- 0004605 PROTO-FIX/ETM/Clean Vial, 50 Sets/Box
- 0004606C PROTO-FIX [2 Vials] /Clean Vial, 50 Sets/Box
- 0004616 PROTO-FIX with CRC, 36/Box
- 0004621 PROTO-FIX, 1 x 1000 ml



Manufactured by Alpha-Tec Systems, Inc.
 1311 SE Cardinal Court, Suite 170
 Vancouver, WA 98683 USA



MDSS GmbH
 Schiffgraben 41
 30175 Hannover, Germany



GLOSSARY OF SYMBOLS



Batch code / Numéro de lot / Número de Lote / Numero di lotto / Lot Nummer / Lotnummer / Lotnummer / Šaržna številka / Número de lote



Catalog number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Numero di catalogo / Katalognummer / Catalog number / Het aantal van de catalogus / Kataloška številka / Número de catálogo



In vitro diagnostic medical device / Pour usage diagnostique in vitro / Para uso diagnóstico in vitro solamente / Solo per uso diagnostico in vitro / Nur zur Verwendung als in vitro-Diagnostikum / Alleen voor in vitro diagnostisch gebruik / För invitrodiagnostik enbart / Samo za invitro diagnostiko / Apenas para uso em diagnóstico in vitro



Authorized representative in the European Community / Représentant européen autorisé / Representante Europeo Autorizado / Rappresentante europeo autorizzato / Autorisierter Europäischer Repräsentant / Germachtigde Europese vertegenwoordiger / Auktoriserad europeisk representant / Pooblaščen evropski predstavnik / Representante Europeu Autorizado



Use-by date / Utiliser avant la date de péremption indiquée / Use antes de la fecha indicada / Utilizzare entro la data indicata / Bis zum angegebenen datum verbrauchen / Gebruik door vermelde datum / Använd innan angivet datum / Porabiti do navadenega datuma / Usar até à data indicada



Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Produttore / Hersteller / Fabrikant / Fabrikant / Proizvajalec / Fabricante



Caution / Attention / Cuidado / Attenzione / Achtung / Voorzichtig / laktag försiktighet / Previdno / Atenção



Temperature limit / Conserver aux températures indiquées / Almacene entre las temperaturas indicadas / Conservare a temperatura comprese fra quelle indicate / Im angegebenen temperaturbereich aufbewahren / Opslaan bij een temperatuur tussen / Förvara mellan angivna temperaturer / Shranjevati med navedenimi temperaturami / Armazene entre as temperaturas indicadas



Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour <n> tests / Contiene suficiente para <n> pruebas / Contenido suficiente per <n> tests / Enthält ausreichend für <n> untersuchungen / Inhoud voldoende voor <n> testen / Innehåller tillräckligt för <n> tester / Vsebinsa zadostuje za <n> testov / Contém quantidade suficiente para <n> testes



Consult instructions for use / Consulter la notice d'utilisation / Consulte las instrucciones para el uso / Consultare le istruzioni per l'uso / Bitte beachten Sie die Anwendungsvorschriften / Raadpleeg instructies voor gebruik / Konsultera bruksanvisningen innan användning / Glej navodila za uporabo / Consulte instruções para o uso



Do not reuse / Ne pas réutiliser / No reutilizar / Non riutilizzare / Nicht wiederverwenden / Niet hergebruiken / Återanvänd inte / Ne uporabljajte znova / Não reutilize