



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

Giardia lamblia antigen

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Deutsch	7
Español	12
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia	18
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	18
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	19
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	20

Product Number: GIA0160S (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Giardia lamblia is one of the most common human intestinal protozoan pathogens worldwide. The incidence strongly depends on the geographic region and reaches 2-7 % in central Europe and exceeds 50 % in tropical countries.

The life cycle of *Giardia lamblia* is characterized by two stages: the trophozoite and the cyst stage. The trophozoite is the motile dividing stage and inhabits the upper small intestine. Ascending infections of the gallbladder may also occur. The cyst is the infective form of the parasite. It develops in the intestine and is excreted with the faeces. Cysts are transmitted via contaminated food or drinking water but also from person to person. The clinical picture of a *Giardia lamblia* infection ranges from the asymptomatic carrier state to acute diarrhea which is often accompanied by abdominal pain and flatulence. Chronic giardiasis can cause severe malabsorption syndrome.

Giardiasis is usually diagnosed by microscopic detection of trophozoites and/or cysts in faecal smears after commonly used staining techniques or direct immune fluorescence. These methods are time-consuming, require trained personnel and can only detect parasites with intact morphology. Immunologic methods like enzyme immunoassays detecting *Giardia lamblia* antigens may overcome these problems.

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis (Lambliasis)	Diarrhoea, nausea, weight loss, malabsorption, abdominal cramps, flatulence and anaemia	Transmission through faecal-oral ingestion of cysts. Adhesive disk allows organism to attach to the surface of intestinal cells, blocking the absorption of fats and vitamins

2. INTENDED USE

The *Giardia lamblia* antigen ELISA is intended for the qualitative determination of *Giardia lamblia* antigens in faeces.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of *Giardia lamblia* antigens is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microplates are coated with polyclonal anti-*Giardia lamblia* antibodies. Diluted patient specimen (stool), and ready to use controls are added to these wells and during the first incubation, *Giardia* antigens present in the stool supernatant are captured. After washing the wells to remove all unbound sample and control a horseradish peroxidase labelled anti-*Giardia* antibody is added which binds to the captured antigen. After incubation and washing off unbound enzyme the antigen-conjugate-complex is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity is proportional to the amount of *Giardia lamblia* antigens in the patient specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Coated microplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with polyclonal anti-*Giardia lamblia* antibodies; vacuum sealed, in resealable aluminium foil.
- **Sample Diluent:** 1 bottle containing 100 ml of ready to use buffer for sample dilution, coloured yellow; ready to use; black cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.25 mol/l; ready to use; yellow cap.
- **Washing Buffer (10x conc.):** 1 bottle containing 100 ml of a 10-fold concentrated buffer for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 12 ml of peroxidase labelled anti-*Giardia lamblia* antibodies, coloured green; ready to use; brown cap; < 2 % NMP (for hazard and precautionary statements see 12.1).
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; blue cap.
- **Positive Control:** 1 bottle containing 2 ml, coloured blue; ready to use; red cap.
- **Negative Control:** 1 bottle containing 2 ml, coloured blue; ready to use; green cap.

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C. After first opening the reagents are stable for another 2 months if stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run! Mix gently without causing foam!

6.1. Coated Microplate

The breakapart snap-off strips are coated with polyclonal antibodies against *Giardia lamblia*. The strips are vacuum sealed. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Buffer (10x conc.)

Dilute Washing buffer 1+9 with distilled water; e.g. 10 ml Washing buffer + 90 ml distilled water. The diluted buffer is stable for 30 days if stored at 2...8 °C.

6.3. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

The test is intended for the detection of *Giardia lamblia* in diluted stool specimen. Either fresh or frozen samples may be used in this test. If samples are stored frozen, thaw sample quickly, warm it to room temperature and mix thawed samples well before dilution. If the assay is performed within 72 hours after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 °C). Avoid repeated freezing and thawing.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all fresh or frozen samples should be diluted 1+10 with Sample Diluent. Pipette 1000 µl sample diluent into a clean tube. Using a disposable stirring rod transfer about 100 mg (about 2-3 mm diameter) of faeces if solid or pipette 100 µl if liquid into the tube with sample diluent and suspend thoroughly, e.g. on a vortex. Allow floating particles to sediment for 10 min at most. If a stool suspension sediments longer than 10 min the sample should be mixed again immediately before starting the assay.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

1. Dispense 75 µl ready to use controls and **100 µl** diluted stool samples (**supernatant**) into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).**
4. When incubation has been completed, remove the foil, decant the content of the wells and wash each well five times with 300 µl of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 2 drops (or 75 µl) of Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 2 drops (or 75 µl) of TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for 10 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 2 drops (or 75 µl) of Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract the absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Negative Control:** mean absorbance value ≤ 0.200
- **Positive Control:** mean absorbance value ≥ 0.800

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The cut-off is calculated by addition of 0.20 absorbance units to the measured absorption of the mean value of the two negative control determinations.

Example: $0.12 \text{ OD Negative Control} + 0.14 \text{ OD Negative Control} = 0.26 \div 2 = 0.13$
Cut-off = absorbance mean value of the Negative Control + 0.20
Cut-off = $0.13 + 0.20 = 0.33$

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **positive** if the absorbance value is equal to or higher than the Cut-off value.

Samples are considered **negative** if the absorbance value is lower than the Cut-off value.

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	12	1.438	6.86
#2	12	1.007	6.41
#3	12	0.673	6.36
#4	12	0.243	5.04

Interassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	11	1.488	4.77
#2	11	1.034	4.64
#3	11	0.656	7.77
#4	11	0.346	10.9

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. 369 known negative samples were tested with this assay in comparison to IFT resulting in a specificity of 99.5% (367/369).

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. 40 known positive samples were tested with this assay in comparison to IFT resulting in a sensitivity of 97.5% (39/40).

10.4. Lower Detection Limit

The lower detection limit of the Giardia lamblia antigen assay was determined by titration of faecal samples spiked with Giardia lamblia cysts and trophozoites from culture. The lower detection limit for Giardia lamblia was determined 5.0 x 10³ cysts and 2.5 x 10⁴ trophozoites per ml of diluted faecal sample.

10.5. Cross Reactivity

Faecal samples positive for one of the following intestinal parasites and other pathogens resp., did not show any cross reactions in this assay:

Adenovirus, Ancylostoma duodenale, Ascaris lumbricoides, Blastocystis hominis, Cryptosporidium parvum, Entamoeba dispar, Entamoeba histolytica, Rotavirus.

Negative stool samples have been spiked with >10⁸ colony forming units of the following microorganisms and tested negative with the Giardia lamblia antigen ELISA.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Clostridium sordellii</i>	ATCC 9714
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

There is no correlation between the measured absorbance and the seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate absorbance of the sample with that of the positive control. Cross-contamination of reagents and samples can produce false results. Incorrect dilutions, not sufficiently homogenized samples and samples, which stayed for sedimentation for more than 10 minutes can cause false results.

A negative ELISA result does not exclude a *Giardia lamblia* infection, because the excretion of cysts is periodic. Thus at least one further stool specimen of the regarding person should be demanded in case of a negative test result but clinical suspect.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- Some of the reagents contain small amounts of Thimerosal (< 1% w/v) and Kathon (1.0% v/v) as preservatives. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. Handle all components as potentially hazardous.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

12.1. Safety note for NMP-containing reagents

The Conjugate contains NMP.

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Danger



H360D

May damage the unborn child.

P280

Wear protective gloves, protective clothing, eye protection.

P308 + P313

IF exposed or concerned: Get medical advice/ attention.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: GIA0160S Giardia lamblia antigen ELISA (96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Giardia lamblia (syn. *Lamblia intestinalis*) ist ein weltweit verbreitetes parasitisches Protozoon. Die Angaben zur Inzidenz reichen von 2-7% in industrialisierten Ländern bis zu über 50% in tropischen Regionen.

Der Lebenszyklus von *Giardia lamblia* ist durch die vegetative Lebensform, den Trophozoiten, und die Zyste als infektiöse Dauerform charakterisiert. Der birnenförmige und durch 4 Geißelpaare aktiv bewegliche Trophozoit parasitiert vorwiegend im Dünndarm, wo er sich mit Hilfe des ventralen Discus am Darmepithel festheftet. Ein Befall der Gallenblase als Folge einer aufsteigenden Infektion ist möglich. Die Trophozoitenform vermehrt sich durch Zweiteilung. Durch externe Faktoren wird die Differenzierung von Trophozoiten zu Zysten ausgelöst.

Die Infektion mit *Giardia lamblia* führt zur Giardiasis. Die klinische Manifestation reicht von asymptomatischer Infektion (asymptomatischer Trägerstatus) bis zu schwerer, akuter Diarrhoe (Lamblie ruhr), die häufig mit krampfartigen Unterleibsschmerzen und Flatulenz einhergeht. Als Folge einer chronischen Giardiasis kann sich ein Malabsorptionssyndrom mit ernsthaftem Gewichtsverlust entwickeln. Nach der etwa fünftägigen Inkubationszeit dauert die Symptomatik in akuten Fällen ca. 5 Tage, in chronischen Fällen bis zu 2 Monate an.

Die Diagnose einer *Giardia lamblia* Infektion erfolgt meist über den mikroskopischen Nachweis von Zysten und/oder Trophozoiten im nativen oder gefärbten Stuhlausstrich. Diese Methode erfordert ebenso wie der fluoreszenzmikroskopische Nachweis erfahrenes Personal, ist zeitaufwendig und subjektiv und setzt darüber hinaus das Vorhandensein morphologisch intakter Parasiten voraus. Dieser Nachteil wird durch immunologische Nachweismethoden, wie z. B. Enzymimmunoassays, die Parasitenantigene im Stuhl detektieren können, überwunden.

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis (Lamblie ruhr)	Diarrhoe, Übelkeit, Gewichtsverlust, Malabsorption, krampfartige Bauchschmerzen und Blähungen und Blutarmut	fäkal-oral (Schmierinfektion) durch Wasser, Nahrungsmittel

2. VERWENDUNGSZWECK

Der *Giardia lamblia* Antigen ELISA ist für den qualitativen Nachweis von *Giardia lamblia* Antigenen in Stuhlproben bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von *Giardia lamblia* Antigen beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Die Mikrotiterplatten sind beschichtet mit *Giardia lamblia*-spezifischen, polyklonalen Antikörpern. Vorhandene spezifische Antigene in der Probe binden an die immobilisierten Antikörper der Mikrotiterplatte. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates mit anti-*Giardia lamblia* Antikörpern. In einem zweiten Waschschriff wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Beschichtete Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit *Giardia lamblia*-Antikörpern; vakuumverschweißt, in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung, gelb gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **Waschpuffer (10x konz.):** 1 Flasche mit 100 ml eines 10-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0,25 mol/l; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 12 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen *Giardia lamblia*, grün gefärbt; gebrauchsfertig; braune Verschlusskappe; < 2 % NMP (für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 12.1).
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; blaue Verschlusskappe.
- **Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 ml; rote Verschlusskappe, blau gefärbt; gebrauchsfertig.
- **Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 ml; grüne Verschlusskappe, blau gefärbt; gebrauchsfertig.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Manuelle oder automatische Waschanlage
- Mikropipetten (10 - 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben. Alle geöffneten Bestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu zwei Monate nach Öffnung stabil.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen! Vorsichtig mischen ohne Schaumbildung!

6.1. Beschichtete Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren vakuumversiegelten Streifen sind mit polyklonalen Giardia lamblia Antikörpern beschichtet. Die Streifen vor der Entnahme aus dem Beutel auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8° C lagern.

6.2. Waschpuffer (10x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1+9 mit destilliertem Wasser zu verdünnen; z.B. 10 ml Waschpuffer + 90 ml destilliertes Wasser. Der verdünnte Puffer ist 30 Tage bei 2...8 °C haltbar.

6.3. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Der Test ist für die Untersuchung von verdünnten Stuhlproben ausgelegt. Werden die Bestimmungen innerhalb von 72 h nach Probenentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tief gefrieren (-20°C). Eingefrorene Proben zügig auftauen, auf Raumtemperatur erwärmen und gut mischen. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

7.1. Probenverdünnung

Proben vor der Testdurchführung 1+10 verdünnen. 1000 µl Probenverdünnungspuffer in ein sauberes Probenröhrchen pipettieren. Bei festem Stuhl ca. 100 mg (2-3 mm Faeces mit einem Rührstab in den Probenverdünnungspuffer geben, bei flüssigem Stuhl 100 µl mit einer Pipette überführen. Probe kräftig mischen z.B. mit einem Vortex. Die Probe höchstens 10 min stehen lassen, damit sich Schwebteile absetzen können. Falls eine Probe länger als 10 min gestanden hat, ist sie direkt vor Testbeginn noch einmal zu mischen.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

1. Je 75 µl Kontrollen und 100 µl vorverdünnte Proben (siehe 7.1.) in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen dekantieren. Anschließend fünfmal mit 300 µl Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!
5. 2 Tropfen (bzw. 75 µl) Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.**
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 2 Tropfen (bzw. 75 µl) TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 2 Tropfen (bzw. 75 µl) Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den Nullabgleich des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Negativkontrolle:** Mittelwert der Extinktion $\leq 0,200$
- **Positivkontrolle:** Mittelwert der Extinktion $\geq 0,800$

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-Off ergibt sich durch die Addition von 0,20 Extinktionseinheiten zum Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Negativkontrollen.

Beispiel: 0,12 OD Negativkontrolle + 0,14 OD Negativkontrolle = 0,26 : 2 = 0,13
Cut-off = Extinktionsmittelwert der Negativkontrolle + 0,20
Cut-off = 0,13 + 0,20 = 0,33

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben mit Extinktionswerten gleich oder höher als die des Cut-offs gelten als **positiv**.

Patientenproben mit Extinktionswerten unterhalb des Cut-offs gelten als **negativ**.

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert (E)	CV (%)
#1	12	1,438	6,86
#2	12	1,007	6,41
#3	12	0,673	6,36
#4	12	0,243	5,04

Interassay	n	Mittelwert (E)	CV (%)
#1	11	1,488	4,77
#2	11	1,034	4,64
#3	11	0,656	7,77
#4	11	0,346	10,9

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Kontrolluntersuchungen mit 369 bekannt negativen Proben ergaben im Vergleich mit einem IFT eine Spezifität von 99,5%.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Kontrolluntersuchungen mit 40 bekannt positiven Proben ergaben im Vergleich mit einem IFT eine Sensitivität von 97,5%.

10.4. Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze wurde durch Titration von mit Zysten und Trophozoiten aufgestockten Stuhlproben mit $5,0 \times 10^3$ Zysten/ml bzw. $2,5 \times 10^4$ Trophozoiten/ml bestimmt.

10.5. Kreuzreaktivität

Stuhlproben mit folgenden intestinalen Parasiten und Durchfallerregern wiesen in Kontrolluntersuchungen keine Kreuzreaktivität auf:

Adenovirus, Ancylostoma duodenale, Ascaris lumbricoides, Blastocystis hominis, Cryptosporidium parvum, Entamoeba dispar, Entamoeba histolytica, Rotavirus.

Negative Stuhlproben wurden mit $>10^8$ Kolonie bildenden Einheiten der folgenden Mikroorganismen aufgestockt und mit dem NovaTec Giardia lamblia ELISA negativ bestimmt:

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Clostridium sordellii</i>	ATCC 9714
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von Giardia lamblia Antigen in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener Extinktion und Schweregrad der Infektion zu. Die Extinktion der Proben darf auch nicht mit der Extinktion der Positivkontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Reagenzien und Proben, unkorrekte Verdünnung, ungenügende Homogenisierung der Proben sowie zu lange sedimentierte Proben können zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen.

Ein negatives Ergebnis schließt eine Infektion mit Giardia lamblia nicht aus, da die Zystenausscheidung bei einer Giardia lamblia Infektion in unregelmäßigen Zeitabständen erfolgt. Aus diesem Grund sollte bei negativem Testergebnis aber dringendem klinischem Verdacht mindestens eine weitere Stuhlprobe des entsprechenden Patienten untersucht werden. Die Gesamtinterpretation sollte im Zusammenhang mit dem klinischen Bild erfolgen.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen Thimerosal (<0,1% w/v) und Kathon (1,0% v/v) als Konservierungsmittel. Verschlucken und Haut- oder Schleimhautkontakt vermeiden! Alle Reagenzien sind als potentiell gefährlich anzusehen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

12.1. Sicherheitshinweis für NMP-haltige Reagenzien

Das Konjugat enthält NMP.

Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Gefahr



H360D

Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

P280

Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz tragen.

P308 + P313

BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

12.2. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: GIA0160S Giardia lamblia antigen ELISA (96 Bestimmungen)

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia es uno de los patógenos intestinales humanos más comunes en todo el mundo de protozoos. La incidencia depende en gran medida de la región geográfica y llega a 2.7% en el centro de Europa y supera el 50% en los países tropicales.

El ciclo de vida de Giardia lamblia se caracteriza por dos etapas: trofozoito y la etapa de quiste. El trofozoito es la etapa de movilidad y habita en el intestino delgado superior. También pueden ocurrir infecciones ascendentes de la vesícula biliar. El quiste es la forma infecciosa del parásito. Se desarrolla en el intestino y se excreta con las heces. Los quistes son transmitidos a través de alimentos contaminados o agua potable, pero también de persona a persona. El cuadro clínico de una infección por Giardia lamblia va desde el estado de portador asintomático hasta diarrea aguda que a menudo se acompaña de dolor abdominal y flatulencia. La Giardiasis crónica puede causar el síndrome de malabsorción severa.

La Giardiasis usualmente se diagnostica mediante la detección microscópica de trofozoitos y/o quistes en frotis fecales después de las técnicas de tinción de uso común o de inmunofluorescencia directa. Estos métodos toman tiempo, requieren de personal entrenado y sólo pueden detectar parásitos con morfología intacta. Métodos inmunológicos como inmunoensayos enzimáticos de detección de antígenos de Giardia lamblia pueden superar estos problemas.

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
Giardia lamblia	Giardiasis (Lambliasis)	Diarrea, náuseas, pérdida de peso, mala absorción, calambres abdominales, flatulencia y anemia	Transmisión fecal-oral a través de la ingestión de los quistes. Discos adhesivos permiten al organismo unirse a la superficie de las células intestinales, bloqueo de la absorción de grasas y vitaminas

2. USO PREVISTO

El enzimoimmunoensayo se utiliza para la determinación cualitativa de antígeno de Giardia lamblia en muestras de heces.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de antígenos de Giardia lamblia se basa en la técnica ELISA (Enzimoimmunoensayo).

Las microplacas están recubiertas con anticuerpos policlonales anti-Giardia lamblia. Muestra del paciente diluida (heces), y controles listos para usar se añaden a estos pozos y durante la primera incubación, se capturan los antígenos de Giardia presentes en el sobrenadante de heces. Después de lavar los pocillos para eliminar toda la muestra y controles no unidos, una peroxidasa de rábano (HRP) marcada con anticuerpo anti-Giardia es adicionada la cual se une al antígeno capturado. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un lector de microplacas ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Microplaca recubierta:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con anticuerpos policlonales de Giardia lamblia, en bolsa de aluminio.
- **Tampón de dilución para la muestra:** 1 botella de 100 ml de solución de tampón para diluir la muestra, de color amarillo; listo para ser utilizado; tapa negra.
- **Tampón de lavado (10x conc.):** 1 botella de 100 ml de una solución de tampón 10x concentrado para lavar los pocillos; tapa blanca.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15 ml de ácido sulfúrico, 0.25 mol/l, listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Conjugado:** 1 botella de 12 ml de conjugado de anticuerpos Anti Giardia lamblia con peroxidasa, color verde; listo para ser utilizado; tapa café; < 2 % NMP (para indicaciones de peligro y consejos de prudencia ver 12.1).
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa azul.
- **Control positivo:** 1 botella de 2 ml, de color azul; listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Control negativo:** 1 botella de 2 ml, de color azul; listo para ser utilizado; tapa verde.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de microplaca con filtros de 450/620 nm
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas para uso de (10-1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Agua destilada

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El kit tiene que estar almacenado de 2...8 °C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior. Todos los componentes abiertos son estables durante un máximo de dos meses, cuando se almacena a 2...8 °C.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras para a la temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de serem utilizados! Mezclar suavemente sin la formación de espuma!

6.1. Microplaca recubierta

Las tiras rompibles están recubiertas con anticuerpos policlonales de Giardia lamblia. Las tiras están selladas al vacío. Permita que las placas selladas alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas. Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C.

6.2. Tampón de lavado (10x conc.)

Diluir la tampón de lavado 1+9 con agua destilada; por ejemplo 10 ml de la tampón de lavado +90 ml de agua destilada. La solución diluida es estable 30 días si se almacena a 2...8 °C.

6.3. Solución de sustrato de TMB

La botella contiene 15 ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente luz azul. Si el sustrato se convierte en azul oscuro, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizada en el ensayo.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El enzimoimmunoensayo se utiliza para la determinación de Giardia lamblia en muestras de heces diluidas. Los especímenes frescos o congelados se pueden usar en este test. Si las muestras se almacenan congeladas, estas deben descongelarse y atemperarse antes de la extracción y el ensayo. Agitar bien antes de diluirlas. Si el ensayo se realiza dentro de las 72 horas después de la toma de la muestras, los especímenes pueden ser almacenadas de 2...8 °C, de lo contrario deben ser almacenados en alícuotas y congelarse (-20 °C). Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+10 con el tampón de dilución para la muestra.

Pipetear 1000 µl de diluyente de muestra en un tubo limpio. Utilizando un dispositivo desechable transferir alrededor de 100 mg (aproximadamente 2-3 mm de diámetro) de las heces si son sólidas o pipetear 100 µl si son líquidas en un tubo con diluyente de muestra y suspender al fondo, por ejemplo, en un vortex. Permitir que las partículas flotantes se sedimenten durante 10 minutos como máximo. Si la suspensión de heces se sedimenta más de 10 minutos la muestra se debe mezclar de nuevo inmediatamente antes de comenzar el ensayo.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en lo esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado de los controles y de las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

1. Pipetear 75 µl de controles y 100 µl muestras prediluidas (ver sección 7.1.) en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25 °C).**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla cinco veces con 300 µl de la Tampón de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una mala precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 2 gotas (resp. 75 µl) de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C).**
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 2 gotas (resp. 75 µl) de sustrato de Solución de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar 10 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25°C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 2 gotas (resp. 75 µl) de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el Solución de sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Ajustar el lector de microplaca (fotómetro) Elisa al cero utilizando el Blanco.

Si por razones técnicas el lector de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de esto debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en la esquema de la placa.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Control negativo:** valor de la extinción $\leq 0,200$
- **Control positivo:** valor de la extinción $\geq 0,800$

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Calculo del valor de la medición

El punto de corte se calcula mediante la adición de 0,20 unidades de absorbancia a la media de la absorbancia obtenida de las dos determinaciones del control negativo.

Ejemplo: $0,12 \text{ OD Control negativo} + 0,14 \text{ OD Control negativo} = 0,26 : 2 = 0,13$

Cut-off = Media de la extinción de Control negativo + 0,20

Cut-off = $0,13 + 0,20 = 0,33$

9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras son consideradas **positivas** cuando el valor de la extinción es igual o superior al Cut-off.

Las muestras son consideradas **negativas** si el valor de la extinción está por debajo del Cut-off.

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1. Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	12	1,438	6,86
#2	12	1,007	6,41
#3	12	0,673	6,36
#4	12	0,243	5,04

Inter ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	11	1,488	4,77
#2	11	1,034	4,64
#3	11	0,656	7,77
#4	11	0,346	10,9

10.2. Especificidad diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. 369 muestras negativas conocidas fueron procesadas con este ensayo en comparación con IFT resultando una especificidad del 99,5% (367/369).

10.3. Sensibilidad de diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del anallito específico. 40 muestras positivas conocidas fueron procesadas con este ensayo en comparación con IFT resultando una sensibilidad del 97,5% (39/40).

10.4. Límite de detección inferior

El límite de detección inferior de antígeno de *Giardia lamblia* se determinó por titulación de muestras fecales tratadas con quistes de *Giardia lamblia* y trofozoitos a partir de cultivos. El límite de detección inferior para *Giardia lamblia* se determinó $5,0 \times 10^3$ quistes y $2,5 \times 10^4$ trofozoitos por ml de muestra fecal diluida.

10.5. Reactividad cruzada

Las muestras fecales positivas para uno de los siguientes parásitos intestinales y otros patógenos respectivamente, no mostraron reacciones cruzadas en este ensayo:

Adenovirus, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histolytica*, Rotavirus.

Muestras de materia fecal negativas se han tratado con $> 10^8$ unidades formadoras de colonias de los siguientes microorganismos y resultados negativos con ELISA *Giardia lamblia* antigen de NovaTec.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Clostridium sordellii</i>	ATCC 9714
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802

Los resultados se basan en los grupos de muestras investigadas; no se trata de especificaciones garantizadas.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

No hay correlación entre la absorbancia medida y la gravedad de la infección. Así mismo, no es permitido correlacionar la absorbancia de la muestra con la del control positivo. La contaminación cruzada de reactivos y muestras puede dar falsos resultados. Diluciones incorrectas, muestras no homogenizadas suficientemente y muestras, que se quedaron sedimentadas durante más de 10 minutos pueden causar falsos resultados.

Un resultado negativo por ELISA no excluye una infección por *Giardia lamblia*, debido a que la excreción de quistes es periódica. Así, al menos, otra muestra de heces de la persona debe ser exigida en caso de un resultado negativo, por sospecha clínica.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HBsAg. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de timerosal (< 1 % w/v) y Kathon (1.0 % v/v) como conservante. Evite la ingestión y contacto con la piel. Todos los reactivos deben ser considerados como potencialmente peligrosos.
- Para evitar contaminación cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar las muestras de los pacientes e dispensar los reagentes precisamente en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

12.1. Nota de seguridad para reactivos que contienen NMP

El Conjugado contiene NMP.

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Peligro



H360D

P280

P308 + P313

Puede dañar al feto.

Llevar guantes/ prendas/ gafas de protección.

EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

12.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación está sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligrosos.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

Nº del producto: GIA0160S Giardia lamblia antigen ELISA (96 determinaciones)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA

Cardona, Guillermo A.; Carabin, Hélène; Goni, Pilar; Arriola, Larraitz; Robinson, Guy; Fernández-Crespo, Juan C. et al. (2011): Identification and molecular characterization of Cryptosporidium and Giardia in children and cattle populations from the province of Alava, North of Spain. In *The Science of the total environment* 412-413, pp. 101–108. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.076.

Faubert, Gaétan (2000): Immune Response to Giardia duodenalis. In *Clinical Microbiology Reviews* 13 (1), pp. 35–54. DOI: 10.1128/CMR.13.1.35-54.2000.

Janoff, Edward N.; Craft, J. Carl; Pickering, Larry K.; Novotny, Thomas; Blaser, Martin J.; Knisley, Cathy V.; Reller, L. Barth (1989): Diagnosis of Giardia lamblia infections by detection of parasite-specific antigens. In *Journal of Clinical Microbiology* 27 (3), pp. 431–435.






Manual of clinical microbiology (1995). 6. ed., [1. Dr.]. Edited by Patrick R. Murray. Washington, DC: ASM Press.

Wolfe, Martin S. (1992): Giardiasis. In *Clinical Microbiology Reviews* 5 (1), pp. 93–100.

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

NMP	N-Methyl-2-pyrrolidone
------------	------------------------

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
GM TP	Microplate / Mikrotiterplatte / Microplaque / Micropiastra / Microplaca / Microplaca
GCONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
GCONTROL +	Positive Control / Positivkontrolle / Contrôle positif / Controllo positivo / Control positivo / Controle positivo
GCONTROL -	Negative Control/ Negativkontrolle / Contrôle négatif / Controllo negativo / Control negativo / Controle negativo
GDIL	Sample Diluent / Probenverdünnungspuffer / Diluant pour échantillon / Tampone diluente / Diluyente de la muestra / Diluente de Amostra
GSOLN STOP	Stop solution / Stopplösung / Solution d'arrêt / Soluzione bloccante / Solução de paragem
GSUB TMB	TMB Substrate solution / TMB-Substratlösung / Solution de substrat TMB / Soluzione substrato TMB / Solución de sustrato de TMB / Solução substrato TMB
GWASH BUF 10x	Washing Buffer 10x concentrated / Waschpuffer 10x konzentriert / Tampon de lavage concentré 10 x / Tampone di lavaggio concentrazione x10 / Tampón de lavado concentrado x10 / Tampão de lavagem concentrada 10x
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SUMMARY OF TEST PROCEDURE / KURZANLEITUNG TESTDURCHFÜHRUNG / RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST / SCHEMA DELLA PROCEDURA / RESUMEN DE LA TÉCNICA / RESUMO DO PROCEDIMENTO DE TESTE

SCHEME OF THE ASSAY

Giardia lamblia antigen ELISA

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the plate layout supplied in the kit.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Positive Control	Sample (diluted 1+10)
Negative control	-	75 µl	-	-
Positive control	-	-	75 µl	-
Sample (diluted 1+10)	-	-	-	100 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Wash each well five times with 300 µl of Washing Buffer				
Conjugate	-	2 drops (or 75 µl)	2 drops (or 75 µl)	2 drops (or 75 µl)
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well five times with 300 µl of Washing Buffer				
TMB Substrate solution	2 drops (or 75 µl)	2 drops (or 75 µl)	2 drops (or 75 µl)	2 drops (or 75 µl)
Incubate for 10 min at room temperature (20...25 °C) in the dark				
Stop Solution	2 drops (or 75 µl)	2 drops (or 75 µl)	2 drops (or 75 µl)	2 drops (or 75 µl)
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)				

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6
 63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
 Email: info@NovaTec-ID.com
 Internet: www.NovaTec-ID.com

GIA0160Sengl,dt,es-17072018-JH-gr.Lot052