




Serazym[®] Giardia

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Giardia lamblia* CWP-1 in Stuhlproben

REF E-106-A  96  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

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 (1, 2). Die Infektion mit *Giardia lamblia* führt zur Giardiasis. Die klinische Manifestation reicht von asymptomatischer Infektion (asymptomatischer Trägerstatus) bis zu schwerer, akuter Diarrhoe („Lamblienruhr“), 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. Durch das Vorkommen sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Säugetierarten hat *Giardia lamblia* auch als Zoonoseerreger Bedeutung (1, 2). 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. Ein Befall der Gallenblase als Folge einer aufsteigenden Infektion ist möglich. Die Trophozoitenform vermehrt sich durch Zweiteilung. Durch bestimmte äußere Faktoren (pH-Wert, Gehalt an Gallensalzen) wird die Differenzierung von Trophozoiten zu Zysten ausgelöst (3, 4, 5). Während des 12-48 stündigen Enzystierungsprozesses werden die für die Zystenwandbildung benötigten Proteine und Glycopolymere im Trophozoiten produziert und in Enzystierungs-spezifischen, sekretorischen Vesikeln (ESV) an die Zelloberfläche transportiert, durch Exocytose freigesetzt und in die Zystenwand inkorporiert. Die Zystenwandproteine (Cyst Wall Proteins) CWP-1 und CWP-2 stellen hierbei die Hauptbestandteile der Zystenwand dar (2, 4, 7).

CWP-1 und CWP-2 haben ein Molekulargewicht von 26 bzw. 29 kDa und lagern sich zu 65 kDa großen Heterodimeren zusammen, die aufgrund ihrer Größe auch als Giardia Spezifisches Antigen, GSA-65 bezeichnet werden (6). Der Enzystierungsprozess verläuft kontinuierlich, aber nicht immer vollständig und betrifft nicht alle Trophozoiten gleichzeitig. Dadurch werden bei einer Infektion mit *Giardia lamblia* auch immer Zystenwandproteine ins Darmlumen freigesetzt und mit dem Stuhl ausgeschieden (2). Der immunologische Nachweis von Giardia spezifischen Zystenwandproteinen mittels Enzymimmunoassay ist für die Diagnostik einer akuten Giardia Infektion etabliert (10). Im Gegensatz dazu ist der mikroskopische Nachweis von Zysten und/oder Trophozoiten im nativen oder gefärbten Stuhlausstrich mit dem Nachteil behaftet, dass nur morphologisch intakte Parasiten nachweisbar sind (8,9).

Literatur:

1. Murray, P.R. (Chief Editor): Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington D.C. Sixth Edition 1995
2. Meyer E.A. Ed. (1990): Giardiasis. Human Parasitic Diseases Volume 3, 32-212. Elsevier Amsterdam, New York, Oxford
3. Faubert, G. (2000): Immune Response to *Giardia duodenalis*. Clinical Microbiology Reviews 13 (1), 35-54
4. Lauwaet et al. (2007): Encystation of Giardia lamblia: A model for other parasites. Curr Opin Microbiol 10(6): 554-559
5. Adam R.D. (2001): Biology of Giardia lamblia. Clinical Microbiology Reviews 14(3): 447-475
6. Rosoff and Stibbs (1986): Isolation and Identification of a Giardia lamblia-Specific Stool Antigen (GSA 65) Useful in Coprodiagnosis of Giardiasis. Journal of Clinical Microbiology 23(5): 905-910
7. Lujan H.D. et al. (1995): Identification of a Novel Giardia lamblia Cyst Wall Protein with Leucine-rich Repeats. The Journal of Biological Chemistry 270 (49): 29307-29313
8. Boone J.H. et al. (1999): TechLab and Alexon Giardia Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits Detect Cyst Wall Protein 1. Journal of Clinical Microbiology 37(3): 611-614
9. Janoff, E.N. et al. (1992): Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by Detection of Parasite Specific Antigens. Journal of Clinical Microbiology 27, 431-435
10. Jelinek, T. und Neifer, S. (2013): Detection of Giardia lamblia in stool samples: a comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays. F1000 Research 2013, 2:39
Last update 14 Feb 2013

Anwendungsbereich

Der **Serazym® Giardia** ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum Nachweis von *Giardia lamblia* Zystenwandprotein 1 (CWP-1) in Stuhlproben.

Testprinzip

Der **Serazym® Giardia** ist ein Enzymimmunoassay auf der Basis polyklonaler Antikörper gegen *Giardia lamblia* Zystenwandprotein 1 (CWP-1). Verdünnte Stuhlproben sowie positive und negative Kontrollen reagieren im ersten Inkubationsschritt (60 min, Raumtemperatur) mit den Festphase-insolubilierten anti-Giardia Antikörpern. Ungebundene Komponenten werden im nachfolgenden Waschzyklus entfernt. Im nächsten Inkubationsschritt (30 min, Raumtemperatur) erfolgt die Reaktion der Festphase-gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexe mit Peroxidase -(POD)-markierten anti-Giardia Antikörpern (Konjugat). Nach erneutem Waschen setzt die POD im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Chromogen/Substratlösung in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach 10 min Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur) durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch sich die blaue Produktlösung gelb färbt. Die bei 450 / \geq 620 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endproduktes ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Antigene direkt proportional.

Testkomponenten

			Für 96 Kavitäten
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti-Giardia CWP-1 Antikörpern (Schaf)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung weiß vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	Waschpuffer 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe
3	DIL	Verdünnungsmedium	100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	CONTROL₊	Positive Kontrolle rekombinante <i>Giardia lamblia</i> Zystenwandproteine	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL₋	Negative Kontrolle <i>Giardia lamblia</i> negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD-markierte polyklonale anti-Giardia CWP-1 Antikörper (Schaf)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt violette Kappe
7	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach der Entnahme bei 2...8°C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht oder eingefroren bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate zu vermeiden. Stuhlproben, die bereits im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können über 72 h bei 2...8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden. In Transportmedien (PARA-PAK PLUS, PARA PAK PLUS SAF) gelagerte Stuhlproben, können im *Serazym*[®] Giardia geringere OD-Werte liefern, als unbehandelte Proben, was bei Proben mit geringer Antigenkonzentration dazu führen kann, dass die OD-Werte unter die Nachweisgrenze des Testes fallen. Es wird daher der Ansatz aus unbehandelten Stuhlproben empfohlen. Sollte jedoch keine unbehandelte Probe zur Verfügung stehen, ist diese unbedingt in der u.a. Verdünnung und nicht unverdünnt im Test einzusetzen.

Vorbereitung und Verwendung

Unbehandelte Stuhlproben auf Raumtemperatur erwärmen und gut durchmischen. In ein Reaktionsgefäß 1000 µl Verdünnungsmedium pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 200 mg (Durchmesser etwa 4 - 6 mm), bei flüssigen Stuhlproben 200 µl in das Probenverdünnungsmedium überführen und sorgfältig suspendieren (Vortex). Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

Konservierte Stuhlproben gut durchmischen. In ein Reaktionsgefäß 250 µl Verdünnungsmedium pipettieren. 1000 µl der in Transportmedium verdünnten Probe in das Probenverdünnungsmedium überführen und gründlich mischen.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette · 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8°C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem Aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen. Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser.

Testdurchführung

Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 verdünnen, z.B. 200 mg oder 200 μ l Stuhlprobe + 1,0 ml Verdünnungsmedium (3).

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen! Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 100 μ l **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 μ l **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 μ l **verdünnte Probe** pipettieren.
3. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 5 mal mit 300 μ l Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 3 Tropfen (oder 100 μ l) **CONJ HRP** POD- Konjugat (6) pro Kavität.
6. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 5 mal mit 300 μ l Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 3 Tropfen (oder 100 μ l) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
9. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
10. 3 Tropfen (oder 100 μ l) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
11. Messen der OD bei 450 nm / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Berechnung der Ergebnisse

Qualitative Evaluierung

Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 0,10

Proben mit OD-Werten gleich oder höher als die des errechneten Grenzwertes sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ im *Serazym*[®] Giardia zu bewerten.

Referenzwert

<i>Serazym</i> [®] Giardia	
Positiv	≥ Cut-off
Negativ	< Cut-off

Aufgrund von Unterschieden in der Population wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen pathologischen und normalen Referenzbereiche bestimmen sollte. Die genannten Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert der negativen Kontrolle ≤ 0,20 (manuelle Abarbeitung)
≤ 0,30 (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der positiven Kontrolle ≥ 0,80

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

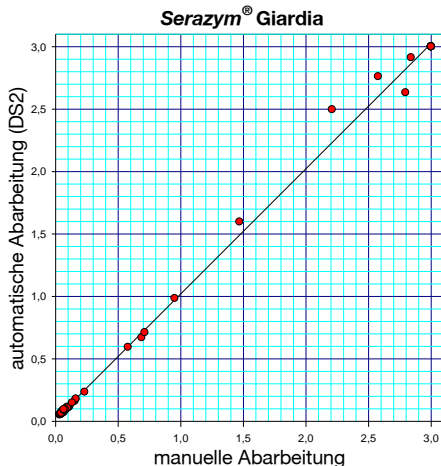
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Giardia lamblia* Antigen in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung, ungenügende Homogenisierung der Proben sowie nicht sedimentierte Festbestandteile können zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen. Ein negatives Ergebnis im ELISA schließt eine Infektion mit *Giardia lamblia* nicht zwingend aus. Eine inhomogene Antigenverteilung in der Probe kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Aus diesem Grund sollte bei negativem Testergebnis aber dringendem klinischem Verdacht eine weitere Stuhlprobe des entsprechenden Patienten untersucht werden. Die Gesamtinterpretation des Testergebnisses im ELISA sollte im Zusammenhang mit dem klinischen Bild erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*[®] Giardia auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2, DSX) können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät und von den individuellen Geräteeinstellungen im Vergleich zur manuellen Bearbeitung höhere OD-Werte gemessen werden. In diesen Fällen ist die Höhe des maximal zulässigen Grenzwertes für die OD der Negativ-Kontrolle auf 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Programmierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mind. 10 sec pro Streifen und Waschschritt) gefolgt von einem Waschschritt mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser und 10 sec Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschriffe von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle - automatische Abarbeitung

Bei der parallelen Untersuchung von 90 Stuhlproben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,999 ermittelt werden.



Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym® Giardia* aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	2,182	0,098	4,79
2	1,175	0,043	3,92
3	0,563	0,027	5,08
4	0,179	0,006	3,59

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym® Giardia* in 8 verschiedenen Testläufen aus Doppelbestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,947	0,144	7,42
2	1,732	0,149	8,63
3	0,760	0,058	7,69
4	0,217	0,020	9,04

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze wurde durch Titration von mit Zysten, Trophozoiten und rekombinantem CWP-1 aufgestockten Stuhlproben im *Serazym® Giardia* mit $1,6 \times 10^3$ Zysten, $6,3 \times 10^4$ Trophozoiten und 3,1 ng CWP-1 pro ml Stuhlsuspension bestimmt.

Spezifität und Sensitivität

Spezifität: Ein Proben-Kollektiv von insgesamt n = 320 Stuhlproben (mikrobiologisches Routinelabor) wurde im *Serazym® Giardia* untersucht: Negativ: n = 317 · Positiv: n = 3 · Spezifität: 99,1%
Im direkten Immunfluoreszenztest wurden die drei im ELISA positiv getesteten Proben als Giardia positiv bestätigt: Spezifität berichtigt: 100%

Sensitivität: Giardia positiv vorcharakterisierte Humanstuhlproben wurden im *Serazym® Giardia* im Vergleich zu zwei weiteren kommerziellen ELISAs untersucht.

n = 33 Humanstuhlproben	ELISA 1 positiv	ELISA 1 negativ
<i>Serazym® ELISA positiv</i>	30	0
<i>Serazym® ELISA negativ</i>	1	2

Sensitivität bezogen auf ELISA 1: 96,8%

n = 23 Humanstuhlproben	ELISA 2 positiv	ELISA 2 negativ
<i>Serazym® ELISA positiv</i>	19	2*
<i>Serazym® ELISA negativ</i>	0	2

Sensitivität bezogen auf ELISA 2: 100%

* Beide Proben, die im *Serazym*[®] ELISA positiv und im ELISA 2 negativ bestimmt wurden, waren sowohl im direkten IFT als auch in ELISA 1 positiv, so dass sie als richtig positiv zu bewerten sind. Giardia positiv vorcharakterisierte Tierkotproben (7 verschiedene Spezies) wurden im *Serazym*[®] Giardia im Vergleich zu zwei weiteren kommerziellen ELISAs untersucht.

n = 60 Tierkotproben	ELISA 1 positiv	ELISA 1 negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	48	0
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	4	8

Sensitivität bezogen auf ELISA 1: 92,3%

n = 54 Tierkotproben	ELISA 2 positiv	ELISA 2 negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	40	7*
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	1**	6

Sensitivität bezogen auf ELISA 2: 97,6%

* Alle 7 im ELISA 2 negativ und im *Serazym*[®] ELISA positiv getesteten Proben wurden im direkten IFT und im ELISA 1 als positiv bestätigt.

** Die im *Serazym*[®] ELISA negativ und ELISA 2 positiv getestete Probe war sowohl im direkten IFT als auch im Vergleichs-ELISA 1 negativ.

Insgesamt wurden 88 Giardia positiv vorcharakterisierte Kot- und Stuhlproben parallel im *Serazym*[®] Giardia und im direkten Immunfluoreszenztest untersucht.

n = 88 Kot- und Stuhlproben	IFT positiv	IFT negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	78	1*
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	1	8

Sensitivität bezogen auf den IFT: 98,7%

* Die ELISA positive, IFT negative Probe wurde in beiden Vergleichs ELISAs 1 und 2 ebenfalls positiv getestet.

Kreuzreaktivität

Stuhlproben mit folgenden intestinalen Parasiten und Durchfallerregern zeigten im *Serazym*[®] Giardia keine Kreuzreaktivitäten:

Adenovirus (n = 2), Rotavirus (n = 6), Astrovirus (n = 4), Norovirus (n = 6), *Clostridium difficile* (n = 2), *Campylobacter jejuni* (n = 6), *Helicobacter pylori* (n = 7), *Salmonella ssp.* (n = 9), *Ancylostoma duodenale* (n = 1), *Ascaris lumbricoides* (n = 2), *Blastocystis hominis* (n = 1), *Cryptosporidium parvum* (n = 4), *Entamoeba dispar/histolytica* (n = 7).

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten pro ml aufgestockt und im *Serazym*[®] ELISA negativ getestet (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<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)
<i>Vibrio cholerae</i>	Klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp <i>O3, O9</i>	Klinische Isolate

Interferenz

Die nachfolgend aufgelisteten Substanzen zeigten bei Zumischung zu positiven und negativen Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis: Bariumsulfat (5%), Buscopan® (2 mg/ml), Cyclamat (5%), Diclofenac (2 mg/ml), Hämoglobin human (5 mg/ml), Blut human (5%), Hylak® N (5%), Iberogast® (5%), Immodium® akut duo (0,2/12,5 mg/ml), Loperamid (0,2 mg/ml), Metronidazol (2 mg/ml), Mucin (5 mg/ml), Nexium® (2 mg/ml), Palmitinsäure (20%), Pentofuryl® (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2,5 mg/ml), Rennie® (8 mg/ml), Simigel® (2 mg/ml), Stearinsäure (20%), Vancomycin (2 mg/ml).

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Labor-Fachpersonal durchgeführt werden. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.**

Das Verdünnungsmedium, der Waschpuffer, die TMB/Substratlösung und Stopplösung kann darüber hinaus Parameter-übergreifend für die Serazym® Stuhlteste Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) und Giardia (E-106) eingesetzt werden.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

Nicht essen, trinken oder rauchen!

Nie mit dem Mund pipettieren!

Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!







Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!













Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2020-10-19	Testdurchführung	Aktualisierung
	Interferenz	Erweiterung
	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung
	Änderungshistorie	Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie"

Inkubationsschema *Serazym*[®] Giardia (E-106)

- | | | | |
|----|---|----------------------------|--|
| 1. |  | 100 µl
100 µl
100 µl | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL +</div> (4)
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL -</div> (5) |
| |  | 60 min
5 x Waschen | verdünnte Stuhlprobe pipettieren
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung |
| 2. |  | 3 Tropfen (oder 100 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ HRP</div> (6) |
| |  | 30 min
5 x Waschen | Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung |
| 3. |  | 3 Tropfen (oder 100 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SUBSTR TMB</div> (7) |
| | | 10 min | Inkubation (Raumtemperatur, lichtgeschützt) |
| 4. |  | 3 Tropfen (oder 100 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">STOP</div> (8) |

Messung der OD bei 450 / \geq 620 nm

	Hersteller		Herstellungsdatum		Verwendbar bis	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">LOT</div>	Charge	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">REF</div>	Artikelnummer
	Vor Sonnenlicht schützen		Temperaturbegrenzung		Biologische Risiken		Nicht wiederverwendbar		
	Gebrauchsanweisung beachten		Achtung	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">IVD</div>	<i>In-vitro</i> - Diagnostikum		Ausreichend für <n> Prüfungen		

Serazym[®] Giardia

Enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* CWP-1 in faecal samples

REF E-106-A  96  *In-vitro*-diagnostic medical device 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

Giardia lamblia (syn. *Lamblia intestinalis*) is one of the most common 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 (1, 2).

The clinical picture of a *Giardia lamblia* infection ranges from the asymptomatic carrier state to acute diarrhea often accompanied by abdominal pain and flatulence. Chronic giardiasis may cause severe malabsorption syndrome. After the incubation time of about 5 days symptoms last for about 5 days in acute cases and up to 2 months in chronic courses of the disease.

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 ability of infecting humans as well as different mammalian species explains the zoonotic potential of this parasite (1, 2).

External factors (pH-value, composition of bile salts) induce the differentiation from trophozoites to cysts (3, 4, 5). During the process of encystation which takes about 12 to 48 hours proteins and glycopolymeric substances needed for the cyst wall formation are produced by the trophozoites. These substances are stored in encystation specific vesicles (ESV) within the cytoplasm of the trophozoites, transported to the cell surface, excreted by exocytosis and incorporated into the cyst wall.

The cyst wall proteins CWP-1 and CWP-2 as the main components of the cyst wall have a molecular weight of 26 and 29 kDa resp. (2, 4, 7), and they form heterodimers of 65 kDa which are also known as **Giardia Specific Antigen**, GSA-65 (6). Encystation is a continuous and often incomplete process leading to the release of cyst wall proteins into the intestine during the progeny of the parasite (2).

The immunological detection of Giardia specific cyst wall proteins by enzyme immunoassay for the diagnosis of acute Giardia infections is established (10). In contrast to microscopy the detection of soluble parasite antigens has the advantage that morphologically intact cysts or trophozoites are not essentially needed (8, 9).

References:

1. Murray, P.R. (Chief Editor): Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington D.C. Sixth Edition 1995
2. Meyer E.A. Ed. (1990): Giardiasis. Human Parasitic Diseases Volume 3, 32-212. Elsevier Amsterdam, New York, Oxford
3. Faubert, G. (2000): Immune Response to *Giardia duodenalis* Clinical Microbiology Reviews 13 (1), 35-54
4. Lauwaet et al. (2007): Encystation of Giardia lamblia: A model for other parasites Curr Opin Microbiol 10(6): 554-559
5. Adam R.D. (2001): Biology of Giardia lamblia. Clinical Microbiology Reviews 14(3): 447-475
6. Rosoff and Stibbs (1986): Isolation and Identification of a Giardia lamblia-Specific Stool Antigen (GSA 65) Useful in Coprodiagnosis of Giardiasis Journal of Clinical Microbiology 23(5): 905-910
7. Lujan H.D. et al. (1995): Identification of a Novel Giardia lamblia Cyst Wall Protein with Leucine-rich Repeats. The Journal of Biological Chemistry 270 (49): 29307-29313
8. Boone J.H. et al. (1999): TechLab and Alexon Giardia Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits Detect Cyst Wall Protein 1. Journal of Clinical Microbiology 37(3): 611-614
9. Janoff, E.N. et al. (1992): Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by Detection of Parasite Specific Antigens. Journal of Clinical Microbiology 27, 431-435
10. Jelinek, T. und Neifer, S. (2013): Detection of Giardia lamblia in stool samples: a comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays. F1000 Research 2013, 2:39
Last update 14 Feb 2013

Intended use

Serazym® Giardia is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of *Giardia lamblia* cyst wall protein 1 (CWP-1) in faecal samples.

Principle of the test

The **Serazym® Giardia** is based on polyclonal antibodies to *Giardia lamblia* cyst wall protein 1 (CWP-1). Within the first incubation step (60 min, room temperature) diluted stool specimens as well as positive and negative controls react with the solid-phase adsorbed polyclonal antibodies. Unbound components are removed by a subsequent washing step. Within the second incubation step (30 min, room temperature) solid-phase bound immune complexes react with the horseradish (HRP)-labelled polyclonal antibodies of the conjugate. Unbound reagents are separated from the solid-phase antibody-antigen-antibody immune complexes by a further washing step. HRP converts the subsequently added colourless chromogenic substrate solution into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells after 10 min incubation at room temperature turning the solution from blue to yellow. The optical density (OD) of the solution read at 450 / \geq 620 nm is directly proportional to the specifically bound amount of *Giardia lamblia* cyst wall protein. Referring to the cut-off value results are interpreted as positive or negative.

Test components

		For 96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with polyclonal anti-Giardia CWP-1 antibodies (sheep)
2	WASHBUF CONC 10x	Wash buffer 10-fold
3	DIL	Sample diluent
4	CONTROL +	Positive control Recombinant <i>Giardia lamblia</i> Cyst wall proteins
5	CONTROL -	Negative control <i>Giardia lamblia</i> negative sample
6	CONJ HRP	HRP-conjugate HRP-labelled polyclonal anti-Giardia CWP-1 antibodies (sheep)
7	SUBSTR TMB	Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide
8	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid

Preparation and storage of samples

Collection and storage

Stool samples should be stored at 2...8°C immediately after collection and processed within 72 hours. Longer storage is possible at -20°C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided. Stool samples already diluted with the *Serazym*[®] sample diluent can be stored over 72 h at 2...8°C before testing. Faecal samples that are already diluted in transportation media (PARA-PAK PLUS, PARA-PAK PLUS SAF) may cause decreased OD values in the *Serazym*[®] Giardia in comparison to untreated samples. In case of samples with low antigen concentration OD values may decrease beyond the detection limit of the test and therefore it is recommended to use untreated samples. If untreated samples are not available the already prediluted sample should be further diluted with *Serazym*[®] sample diluent as stated below.

Preparation

Fresh, untreated samples

Quickly thaw frozen samples. Warm samples to room temperature and mix well. Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube. Using a disposable stirring rod transfer about 200 mg (diameter about 4 - 6 mm) of faeces if solid or 200 µl if liquid into the tube and suspend thoroughly. If necessary, sediment floating particles by a centrifugation step with a micro centrifuge for one min at maximum speed.

Conserved samples, prediluted in transportation media

Mix sample thoroughly. Pipette 250 µl sample diluent into a clean tube, transfer 1000 µl of the prediluted sample to this tube and mix well.

Materials required but not provided

Micropipettes · multi-channel pipette or multi-pipette · reagent container for multi-channel pipette · 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer · microplate reader with optical filters of 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · distilled or deionized water · glassware · tubes (2 ml) for sample preparation

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label, that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8°C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least two months, provided proper storage. The ready to use wash solution can be used for at least one month when stored at 2...8°C.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed. Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

Example: 10 ml wash buffer concentrate (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Assay procedure

Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 6, e.g. 200 mg or 200 μ l faeces + 1.0 ml sample diluent (3).

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that residual fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette: 100 μ l **CONTROL +** positive control (4)
100 μ l **CONTROL -** negative control (5)
100 μ l **diluted sample**.
3. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 5x with 300 μ l wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. 3 drops (or 100 μ l) **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well.
6. Cover plate and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 5x with 300 μ l wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. 3 drops (or 100 μ l) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
9. Incubate for 10 min at RT protected from light.
10. 3 drops (or 100 μ l) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
11. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Result interpretation

Qualitative evaluation

Cut-off determination: OD negative control + 0.10

Samples with OD values equal with or higher than the cut-off are considered positive, samples with OD values below the cut-off are considered negative for *Giardia lamblia* antigen.

Reference values

Serazym® Giardia	
Positive	≥ Cut-off
Negative	< Cut-off

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges as usually done for other diagnostic parameters, too. Therefore, the mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

Test validity

The test run is valid, if:

- the mean OD of the negative control is ≤ 0.20 (manual performance)
≤ 0.30 (automatic performance)
- the mean OD of the positive control is: ≥ 0.80

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the procedure

There is no correlation between measured absorbance and seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate the absorbance of a sample with that of the positive control.

Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions, not sufficiently homogenized samples or solid particles after centrifugation of the diluted sample can cause false negative as well as false positive results.

A negative test result not necessarily excludes a *Giardia lamblia* infection. Inhomogeneous antigen distribution in the sample can cause false negative results. Therefore in case of a negative test result but clinical suspicion of an infection a further sample of the respective person should be investigated. A final interpretation of the test result should always consider clinical findings as well.

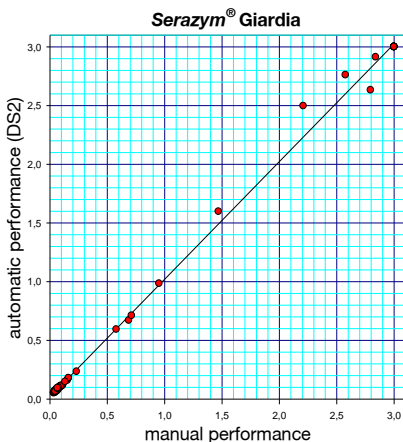
Automatic processing

Performing the *Serazym® Giardia* on fully automated microplate processors (e.g. DS2, DSX) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment. In these cases a maximum value of 0.3 absorbance units is permissible for the negative control.

It is recommended to use a wash procedure including 10 seconds soak time per strip and wash step followed by a wash step with distilled or deionized water with 10 seconds of soak time after the final wash step of each wash cycle. If necessary the number of washing steps can be enhanced from 5x to 7x - 8x.

Correlation: manual - automatic processing

A panel of 90 faecal specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with 0.999.



Performance characteristics

Precision

Intra-Assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Giardia from 8-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	2.182	0.098	4.79
2	1.175	0.043	3.92
3	0.563	0.027	5.08
4	0.179	0.006	3.59

Inter-Assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Giardia in 8 different test runs from twofold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.947	0.144	7.42
2	1.732	0.149	8.63
3	0.760	0.058	7.69
4	0.217	0.020	9.04

Lower detection limit

The lower detection limit of Giardia antigen in the *Serazym*[®] Giardia was determined by titration of cysts, trophozoites and recombinant CWP-1, diluted in a negative stool sample:

1.6 x 10³ cysts, 6.3 x 10⁴ trophozoites and 3.1 ng CWP-1 per ml stool suspension.

Specificity and sensitivity

Specificity: In all n = 320 stool samples from routine microbiology laboratory were investigated by the *Serazym*[®] Giardia: Negative: n = 317, Positive: n = 3, Specificity: 99.1%.

The 3 ELISA positive samples were reinvestigated by direct immunofluorescence and confirmed as true positive. Specificity amended: 100%.

Sensitivity: Human stool samples designated Giardia positive were tested in the *Serazym*[®] Giardia in comparison to 2 commercially available ELISAs.

n = 33 Human stool samples	ELISA 1	ELISA 1
	positive	negative
<i>Serazym</i> [®] ELISA positive	30	0
<i>Serazym</i> [®] ELISA negative	1	2

Sensitivity compared to ELISA 1: 96.8%

n = 23 Human stool samples	ELISA 2	ELISA 2
	positive	negative
<i>Serazym</i> [®] ELISA positive	19	2*
<i>Serazym</i> [®] ELISA negative	0	2

Sensitivity compared to ELISA 2: 100%

* Both samples with a positive test result in the *Serazym*[®] Giardia and a negative test result in ELISA 2 were confirmed true positive by direct immunofluorescence and ELISA 1.

Faecal samples from animals belonging to 7 different species were tested by *Serazym*[®] Giardia in comparison to 2 commercially available assays.

n = 60 animal faecal samples	ELISA 1 positive	ELISA 1 negative
<i>Serazym</i>[®] ELISA positive	48	0
<i>Serazym</i>[®] ELISA negative	4	8

Sensitivity compared to ELISA 1: 92.3%

n = 54 animal faecal samples	ELISA 2 positive	ELISA 2 negative
<i>Serazym</i>[®] ELISA positive	40	7*
<i>Serazym</i>[®] ELISA negative	1**	6

Sensitivity compared to ELISA 2: 97.6%

* The 7 samples with negative test result in ELISA 2 but positive in the *Serazym*[®] ELISA were confirmed true positive by direct immunofluorescence and ELISA 1.

** The *Serazym*[®] ELISA negative but ELISA 2 positive sample was tested negative by direct immunofluorescence and ELISA 1.

In all 88 samples (human and animal samples) designated Giardia positive were tested in parallel by *Serazym*[®] Giardia and direct immuno fluorescence.

n = 88 faecal and stool samples	IFT positive	IFT negative
<i>Serazym</i>[®] ELISA positive	78	1*
<i>Serazym</i>[®] ELISA negative	1	8

Sensitivity compared to IFT: 98.7%

* The ELISA positive, IFT negative sample reacted positive in both comparative ELISAs 1 and 2 as well.

Cross reactivity

Stool samples positive for one of the subsequent pathogens have been tested with the *Serazym*[®] Giardia and showed no cross reactivity:

Adenovirus (n = 2), *Rotavirus* (n = 6), *Astrovirus* (n = 4), *Norovirus* (n = 6), *Clostridium difficile* (n = 2), *Campylobacter jejuni* (n = 6), *Helicobacter pylori* (n = 7), *Salmonella ssp.* (n = 9), *Ancylostoma duodenale* (n = 1), *Ascaris lumbricoides* (n = 2), *Blastocystis hominis* (n = 1), *Cryptosporidium parvum* (n = 4), *Entamoeba dispar/histolytica* (n = 7).

Negative stool samples have been spiked with $\geq 10^8$ colony forming units per ml of the following microorganisms and were tested negative with the *Serazym*[®] Giardia (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<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)
<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp <i>O3, O9</i>	clinical isolates

Interference

None of the following substances added to positive and negative stool samples showed a significant impact on the test result:

Barium sulfate (5%), Buscopan® (2 mg/ml), Cyclamate (5%), Diclofenac (2 mg/ml), Hemoglobine human (5 mg/ml), Blood human (5%), Hylak® N (5%), Iberogast® (5%), Immodium® akut duo (0.2/12.5 mg/ml), Loperamide (0.2 mg/ml), Metronidazole (2 mg/ml), Mucin (5 mg/ml), Nexium® (2 mg/ml), Palmitic acid (20%), Pentofuryl® (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2.5 mg/ml), Rennie® (8 mg/ml), Simgel® (2 mg/ml), Stearic acid (20%), Vancomycin (2 mg/ml).

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. Do not use reagents from damaged packages or bottles. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. **Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution.**

The sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution is universally applicable for the *Serazym*® stool ELISA Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) and Giardia (E-106).

Do not use reagents from other manufacturers. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8°C before use. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should generally be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!

Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!







Note safety precautions of the single test components!



History of Changes

Version	Section	Modifications
2020-10-19	Intended use	Correction
	Assay procedure	Update
	Cross reactivity	Extension
	Common Advices and Precautions	Update
	History of Changes	New section "History of Changes"

Incubation Scheme Serazym® Giardia (E-106)

1.  pipette
 100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **diluted stool sample**
 60 min incubation (room temperature)
 5 x wash with wash solution
2.  3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 30 min incubation (room temperature)
 5 x wash with wash solution
3.  3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min incubation (room temperature) protected from light
4.  3 drops (or 100 µl) **STOP** (8)

Read OD at 450 / \geq 620 nm



Manufacturer



Date of manufacture



Use by



Batch code



Catalog number



Keep away from sunlight



Temperature limits



Biological risks



Do not reuse



Consult instructions for use



Caution



In-vitro-diagnostic medical device



Contains sufficient for <n> tests

