

MegaELISA® GIARDIA ad us. vet.

Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis
von *Giardia duodenalis* im Kot von Heim-, Klein- und Großtieren

In vitro Diagnostikum

GEBRAUCHSINFORMATION

Enzyme immunoassay for the qualitative detection
of *Giardia duodenalis* in feces of pocket pets, pets and farm animals

In vitro diagnosticum

INSTRUCTIONS FOR USE

Art. No. 850096EG1

Hersteller/Manufacturer:



Lochauer Str. 2
A-6912 Hörbranz – AUSTRIA
☎ (+43) 5573 85400
📄 (+43) 5573 85400-4
✉ elisa@megacor.at
🌐 www.megacor.com

Version 06/2023

MegaELISA® GIARDIA ad us. vet.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	3
2. Verwendungszweck	3
3. Testprinzip	4
4. Testkitkomponenten	4
5. Haltbarkeit und Lagerung	5
6. Informationen zum Probenmaterial	6
7. Testvorbereitung	6
8. Testdurchführung	7
9. Testauswertung	9
10. Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise	10
11. Haftung	11
12. Kurz-Protokoll MegaELISA® GIARDIA	12
Abkürzungen	2

Content	page
1. Introduction	13
2. Intended use	13
3. Test principle	14
4. Test-kit components	14
5. Stability and storage	15
6. Information on the sample material	16
7. Test preparation	16
8. Test procedure	17
9. Test evaluation	19
10. Safety measures and precautions	20
11. Liability	21
12. Short protocol MegaELISA® GIARDIA	22
Abbreviations	2

Abkürzungen / Abbreviations

- H₂O₂ Wasserstoffperoxid/Hydrogen peroxide
- HRP Meerrettich-Peroxidase/Horseradish peroxidase
- PPM Proben-Puffer-Mischung (DE)
- PVP Probenverdünnungspuffer (DE)
- SBM Sample buffer mixture (EN)
- SDB Sample dilution buffer (EN)
- TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin / 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

1. EINLEITUNG

Die Giardiasis, eine weltweit vorkommende parasitäre Durchfallerkrankung bei Heim-, Klein-, Groß- und Wildtieren sowie beim Menschen (Zoonose), wird durch *Giardia duodenalis* verursacht. Die Spezies *G. duodenalis* kommt bei den verschiedenen Tierarten und beim Menschen in verschiedenen Genotypvarianten (A bis G) vor, die sich in ihrer Infektiosität und ihrem Wirtsspektrum unterscheiden. Die Typen A und B besitzen zoonotisches Potential, die anderen sind mehr oder weniger wirtsspezifisch. Überwiegend betroffen sind Neugeborene bzw. Jungtiere. Die Prävalenzen variieren bei Hunden und Katzen je nach Alter (>70% unter 1 Jahr), Haltungsform (10% bei Einzelhaltung, bis zu 100% in Zuchten und Tierheimen) und Immunstatus. Die Übertragung (direkter Kontakt, über kontaminiertes Futter, Wasser, Gegenstände, Fellpflege sowie Vektoren wie Fliegen etc.) erfolgt fäkal-oral durch Aufnahme der von anderen Tieren/Menschen ausgeschiedenen hochinfektiösen und extrem umweltresistenten Zysten. Nur 5 bis 10 Zysten reichen für eine Infektion.

G. duodenalis weist einen asexuellen Lebenszyklus auf. Im Dünndarm der infizierten Tiere schlüpfen aus den aufgenommenen Zysten jeweils zwei Wachstumsformen, sogenannte vegetative Trophozoiten (Exzystierung). Diese vermehren sich durch Zweiteilung und heften sich mittels Haftscheiben an die Darmepitheloberfläche. Freie Trophozoiten verwandeln sich v.a. im Ileum in ihre Zysten-Dauerformen (Enzystierung). Diese werden in großen Mengen (10⁷/g Kot) und meist intermittierend, d.h. nicht mit jedem Kotabsatz, ausgeschieden. Die Präpatenz beträgt Ø 5 bis 16 Tage.

Hauptsymptom der Giardiasis ist mehr oder weniger starker Durchfall, der sowohl symptomatisch (akut, chronisch, selbstlimitierend, periodisch-intermittierend oder kontinuierlich) als auch asymptomatisch verlaufen kann. Unabhängig von der Verlaufsform können Zysten und/oder Trophozoiten (v.a. bei starkem Durchfall) ausgeschieden werden. Giardia-Zysten können von Zysten verschiedener Kokzidienarten nur von mikroskopisch Versierten unterschieden werden. Dies gilt ebenso für Giardia- und *Tritrichomonas foetus*-Trophozoiten.

Zahlreiche Studien verweisen auf die Überlegenheit des Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von *Giardia duodenalis* gegenüber konventionellen Giardien-Nachweismethoden wie dem mikroskopischen Zysten- und/oder Trophozoitennachweis im direkten Kotausstrich bzw. nach Anreicherung durch Flotationsmethode bzw. im modifizierten Sedimentationsverfahren („MIFC-Verfahren“) oder gar mittels Dünndarmbiopsie.

Durch seine hohe Sensitivität und Spezifität eignet sich der **MegaELISA® GIARDIA** hervorragend als Standardtest für Veterinärlaboratorien zum routinemäßigen, schnellen und v.a. standardisierbaren Nachweis von intakten *G. duodenalis* bzw. den Zerfallsprodukten von *G. duodenalis*-Zysten und/oder Trophozoiten.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **MegaELISA® GIARDIA** ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von *Giardia duodenalis*-Antigenen im Kot von Heim-, Klein- und Großtieren.

3. TESTPRINZIP

Der **MegaELISA® GIARDIA** ist ein indirekter qualitativer Immunoassay-Nachweis von *Giardia duodenalis*-Antigenen.

An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind monoklonale Antikörper gegen spezifische Giardien-Antigene gebunden. Eine Suspension der zu untersuchenden Kotprobe bzw. die Kontrollen werden zusammen mit biotinylierten Anti-*Giardia*-Antikörpern (Konjugat 1) zur Inkubation bei Raumtemperatur (20–25°C) in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Bei Anwesenheit von *Giardia*-Antigenen bildet sich ein Sandwich-Komplex aus dem immobilisierten Antikörper, dem *Giardia*-Antigen und dem biotinylierten Antikörper. Nach einem Waschschrift wird Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat (Konjugat 2) dazugegeben und erneut bei Raumtemperatur (20–25°C) inkubiert. Nicht gebundenes Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen *Giardia*-Antigene.

4. TESTKITKOMPONENTEN

4.1. MITGELIEFERTE REAGENZIEN / TESTKITKOMPONENTEN

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

	96er Kit	Inhalt
1.	12 teilbare Streifen	Mikrotiterplatte mit teilbaren Mikrotiterstreifen im Halterahmen mit je 8 Bestimmungen, beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen <i>G. duodenalis</i>
2.	100 ml	Probenverdünnungspuffer (PVP, Protein-gepufferte NaCl-Lösung, blau gefärbt), gebrauchsfertig, weiße Kappe
3.	100 ml	Waschpuffer (10× Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung, enthält 0,1 % Thimerosal), braune Kappe
4.	2 ml	Positivkontrolle (inaktiviertes <i>G. duodenalis</i> -Antigen), gebrauchsfertig, rote Kappe
5.	2 ml	Negativkontrolle , gebrauchsfertig, blau gefärbt, weiße Kappe
6.	13 ml	Konjugat 1 (Biotin-konjugierte monoklonale Anti- <i>G. duodenalis</i> -Antikörper in stabilisierter Proteinlösung, rot gefärbt), gebrauchsfertig, orange Kappe
7.	13 ml	Konjugat 2 (Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat in stabilisierter Proteinlösung), gebrauchsfertig, orange gefärbt, weiße Kappe
8.	13 ml	Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [TMB]/H ₂ O ₂), gebrauchsfertig, blaue Kappe. Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.

	96er Kit	Inhalt
9.	12 ml	Stopp-Reagenz (1 M Schwefelsäure), gebrauchsfertig, gelbe Kappe
10.	1	Folie zum Abdecken
11.	1	Evaluationsblatt
12.	1	Gebrauchsinformation

4.2. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTRE REAGENZIEN / ZUBEHÖR

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Einmal-Probenröhrchen
- Einmal-Kunststoffpipetten
- Laborpipetten (Bereich zwischen 5 und 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Filterpapier/Labortücher
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschautomat für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, evtl. Referenzfilter 620 nm)
- Abfallbehälter mit einer 0,5%-igen Hypochloritlösung

5. HALTBARKEIT UND LAGERUNG



Lagerung
2–8°C



Verwendbar bis
– siehe Etikett



Für den tierärztlichen
Gebrauch



Chargen-Bezeichnung



In vitro Diagnostikum



Keine Reagenzien ver-
schiedener Testkits, Char-
gennummern oder mit
abgelaufenem Verfallsda-
tum verwenden.



Gebrauchsinformation
genau beachten

- Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Bei Öffnung des verschweißten Aluminiumbeutels der Mikrotiterplatte ist darauf zu achten, dass der wiederverschließbare Klippverschluss nicht beschädigt oder gar abgetrennt wird.
- Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist unbedingt zu vermeiden, um Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation zu verhindern. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden (Funktionsunfähigkeit).

6. INFORMATIONEN ZUM PROBENMATERIAL

- Es können Kotproben von Heim-, Klein- und Großtieren verwendet werden.
- Beachten Sie, dass das Probenmaterial, ebenso wie alle verwendeten Testkitkomponenten, zum Zeitpunkt der Anwendung Raumtemperatur haben sollte.
- Für den Test wird, je nach Konsistenz, die unter Punkt 7.3/Probenvorbereitung vorgeschriebene Menge an Kot benötigt.
- Es ist darauf zu achten, dass die Kotproben in adäquaten Transportgefäßen gesammelt werden. Kontakt der Kotprobe mit Transportmedien, Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien sind zu vermeiden, da diese zu Interferenzen mit dem **MegaELISA® GIARDIA** führen können. Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Kotprobenmaterial (mind. 100 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.
- Auf Grund der i. d. R. inhomogenen oder „nesterartigen“ Verteilung von Antigenen in der Kotprobe vor Probenentnahme muss diese mit Hilfe eines Spatels oder Vortex-Mixers homogen verrührt werden.
- Ungekühlt (20–25°C) sollte der Kot innerhalb von 4 Stunden getestet werden. Bei 2–8°C kann die Probe bis max. 3 Tage, dauerhaft bei mindestens –20°C gelagert werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Wiederaufgetaute Proben sind vor dem Verdünnen unbedingt homogen zu vermischen (optimal mit Vortex-Mixer).
- Bei Untersuchungen von größeren Tiergruppen (gleicher Stall/Haushalt) sollten auch Kotproben von klinisch unauffälligen Tieren/Kontakttieren zur Untersuchung herangezogen werden, um asymptomatische Trägartiere zu identifizieren.

7. TESTVORBEREITUNG

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsinformation genau zu befolgen. Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen. Für jeden Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

7.1. ALLGEMEINES

- Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Aluminiumbeutel zu entnehmen. Zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten empfiehlt es sich, diese abzudecken oder abzukleben. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen sofort wieder in den Beutel geben, den Beutel verschließen und bei 2–8°C lagern.
- Die Reagenzien sind unmittelbar vor ihrer Verwendung gut zu mischen.
- Nach Gebrauch sind die Reagenzien wieder bei 2–8°C zu lagern.
- Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Beschädigte Testkitkomponenten dürfen nicht verwendet werden.

- Ein direkter Kontakt von Proben mit den Testkitkomponenten ist zu vermeiden (Kreuzkontamination).
- Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung vermeiden.

7.2. HERSTELLUNG DES WASCHPUFFERS 1:10

1 Teil des Waschpufferkonzentrates wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Sollten im Waschpufferkonzentrat Kristalle zu sehen sein, lösen Sie diese durch Erwärmen des Waschpufferkonzentrates im Wasserbad bei 37°C auf. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2–8°C 4 Wochen haltbar.

7.3. PROBENVORBEREITUNG / PROBENVERDÜNNUNG 1:11

- Geben Sie 1 ml (1000 µl) **MegaELISA® GIARDIA** Probenverdünnungspuffer (PVP) in ein gekennzeichnetes Einmal-Probenröhrchen.
- Saugen Sie mit einer Einmal-Kunststoffpipette ca. 100 µl flüssigen Kot auf bzw. entnehmen Sie mit einer Einweg-Impföse oder einem Spatel ca. 50–100 mg breiig-festen Kot und geben Sie die Probe in den PVP.
- Homogenisieren Sie die Proben-Puffer-Mischung (PPM) gut (mehrmaliges Mischen mit der Pipette oder auf einem Vortex-Mixer). Lassen Sie die Probe danach kurz stehen, damit die groben Kotpartikel sich absetzen/sedimentieren können.
- Der so gewonnene Überstand kann nun direkt für den Test verwendet werden.
- **ACHTUNG:** Bei Verwendung eines ELISA-Waschautomaten muss der Überstand partikelfrei sein. Um dies zu gewährleisten, zentrifugieren Sie die PPM bei 2500 g für 5 Minuten.
- Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

- Probenmaterial vor der Verwendung gut homogenisieren.
- **Es wird empfohlen, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung zu testen.**
- Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Evaluationsblatt die Position der Patientenproben und der Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen.

8.1. PROBENAUFTRAG UND ERSTE INKUBATION

- Stecken Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen in den Halterahmen.
- Geben Sie jeweils **100 µl**
 - **Positivkontrolle**
 - **Negativkontrolle**
 - **verdünnte Proben (PPM)**in der gewünschten Reihenfolge in die jeweilige Vertiefung des Mikrotiterstreifens.
- Geben Sie je **100 µl Konjugat 1** (Biotin-konjugierter Antikörper) in jede Vertiefung und **mischen** Sie die Suspensionen durch leichtes Antippen an den Plattenrand.
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**.

8.2. WASCHEN – SORGFÄLTIG und STRIKT NACH ANLEITUNG!

WASCHEN PER HAND

- Entsorgen Sie das Inkubat durch Ausleeren in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit. Gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgen.
- Klopfen Sie die Mikrotiterplatte mehrmals auf einem saugfähigen Papier/Labortuch aus.
- Waschen Sie 5× mit jeweils 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung. Platte mit Waschlösung leicht schwenken, dann ausklopfen.
- **Zwischen jedem Waschgang komplett entleeren und dann sorgfältig mehrmals auf einer trockenen, unbenutzten Stelle ausklopfen.**
- Vor dem letzten Ausklopfen darauf achten, dass das Reagenz für den nächsten Pipettierschritt bereit steht.

WASCHEN PER WASCHAUTOMAT

- **ACHTUNG:** PPM mit Partikeln sollten vor dem ersten Waschschrift manuell durch Ausklopfen aus den Vertiefungen entfernt werden (Verstopfungsgefahr der Waschnadeln).
- Korrekte Einstellung des Automaten beachten (5×300 µl).
- Zur Erzielung optimaler Waschergebnisse mindestens 300 µl Waschpuffer pro Kavität und Waschschrift verwenden.
- Komplettes Absaugen der Flüssigkeit nach jedem Waschschrift.
- Nach letztem Waschschrift Platte gründlich auf saugfähigem Papier/Labortuch ausklopfen. Es sollte keine Restfeuchtigkeit in den Kavitäten zurückbleiben.

8.3. ZWEITE INKUBATION

- Geben Sie je **100 µl Konjugat 2** (Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat) in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte.
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie diese für **15 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**.

8.4. WASCHEN

- Waschen wie in Punkt 8.2.

8.5. DRITTE INKUBATION

- Geben Sie **100 µl Substrat (TMB)** in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte.
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **genau 15 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** und **im Dunkeln**.
- Geben Sie **50 µl Stopp-Reagenz** in jede Vertiefung, in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit wie für die TMB-Substratlösung.

8.6. MESSUNG

- Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Antippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm gemessen. Eine zusätzliche Messung in der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.
- Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen Luft – also ohne Mikrotiterplatte – erfolgen.
- Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.
- **ACHTUNG:** Stark positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate der Substratlösung verursachen. Vorverdünnung der Probe mit physiologischer NaCl-Lösung, z. B. 1+1, wird empfohlen. Dann die Probe 1:11 mit Probenverdünnungspuffer verdünnen und die Ergebnisse mit 2 multiplizieren.

9. TESTAUSWERTUNG

9.1. REAGENZIENSTABILITÄT – INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jeder Testung sollten Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt werden, um die Stabilität der Reagenzien sowie die korrekte Testdurchführung sicherzustellen.

Der Test war korrekt, wenn folgende Richtwerte erreicht werden:

- **Negativkontrolle** (450 nm) **OD < 0,2** bzw. (450/620 nm) **OD < 0,160**

und

- **Positivkontrolle** (450 nm bzw. 450/620 nm) **OD > 0,8**

Sollte die OD der Negativkontrolle bei 450 nm > 0,2 (450/620 nm OD > 0,160) liegen, war der Waschvorgang vermutlich ungenügend.

Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Vertiefungen ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegeben Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (Kalibrierung)
- Visuelle Kontrolle der Testkitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

9.2. CUT-OFF

Zur Festlegung des Cut-offs werden zu der gemessenen Extinktion der Negativkontrolle 0,15 Extinktionseinheiten hinzuaddiert.

Cut-off = Extinktionswert der Negativkontrolle + 0,15

9.3. AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE

Positives Testergebnis

Probe, deren Extinktionswert mehr als 10 % über dem errechneten Cut-off liegt.

Grenzwertiges Testergebnis

Probe, deren Extinktionswert im Bereich von 10 % oberhalb und unterhalb des Cut-offs liegt. Ist eine Wiederholungsuntersuchung mit einer frischen Probe ebenfalls grenzwertig, ist diese als negativ zu bewerten.

Negatives Testergebnis

Probe, deren Extinktionswerte mehr als 10 % unter dem errechneten Cut-off liegt.

9.4. INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

- Die Diagnose einer Infektionserkrankung sollte nicht aufgrund eines einzelnen Tests gestellt werden. Eine konkrete Diagnose sollte sowohl Klinik, Symptomatik als auch serologische Daten berücksichtigen.
- Bakterielle Kontamination oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe können die Extinktionswerte beeinflussen.
- Der **MegaELISA® GIARDIA** weist Antigene von *Giardia duodenalis* im Kot von Heim-, Klein- und Großtieren nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden.
- Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.
- Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Giardien-Infektion nicht aus. Bei bestehender Durchfallproblematik und einmalig negativem Test sollte ein neuer Test mit einer neuen Kotprobe (optimal Sammelkotprobe: Einzeltestung von mindestens drei aufeinanderfolgenden Kotproben) nach 7 Tagen durchgeführt werden.
- Ein grenzwertiges Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung der Giardien in der Kotprobe verursacht werden. Deshalb sollte in diesem Fall eine zweite Suspension aus der gleichen Kotprobe untersucht werden oder eine weitere Stuhlprobe zur Untersuchung angefordert werden.

10. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Tragen von Schutzkleidung (Einmal-Handschuhe, Laborkittel, Schutzbrille) und Händewaschen nach Ende der Testdurchführung.
- Essen, Trinken und Rauchen während der Testdurchführung verboten.
- Das Probenmaterial und die Kontrollen müssen als potentiell infektiös angesehen werden und sind mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen zusammen verwenden.

- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen nach Gebrauch sofort fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Reagenzien-Fläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- – Waschpuffer enthält Thimerosal als Konservierungsmittel.
- – Stopp-Reagenz enthält 1 M Schwefelsäure. Schwefelsäure irritiert Augen und Haut. Bei Kontakt mit Augen intensiv mit Wasser spülen und den Arzt aufsuchen. Außerhalb der Reichweite von Kindern aufbewahren.
- – Substratlösung enthält Wasserstoffperoxid.

Eine Berührung mit Augen, Haut oder Schleimhaut ist unbedingt zu vermeiden.

- **ACHTUNG:** Flüssigabfall, der Stopp-Reagenz enthält, muss zuerst neutralisiert werden, bevor er in eine Hypochloritlösung gegeben wird.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Beschriften Sie Probenmaterial und zugehöriges Probenröhrchen, damit die exakte Zuordnung gewährleistet ist.
- Für jede Probe ein neues Probenröhrchen verwenden.
- Während der Inkubations- und Waschschriffe müssen die Vertiefungen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.
- Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sollten nicht länger leer bleiben als unbedingt notwendig.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Testergebnissen Patientenproben und Konjugate sorgfältig in die Vertiefungen pipettieren.
- Der **MegaELISA® GIARDIA** ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, das die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind 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 nicht für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse, die mit diesen Gründen in Zusammenhang stehen. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.

11. HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

12. KURZ-PROTOKOLL MegaELISA® GIARDIA

TESTVORBEREITUNG

Benötigte Mikrotiterstreifen und Reagenzien auf **Raumtemperatur (20–25°C)** bringen.

Waschpuffer 1:10 mit destilliertem Wasser **verdünnen**.

Proben 1:11 mit Probenverdünnungspuffer **verdünnen** (100 µl Kot + 1000 µl PVP)

TESTDURCHFÜHRUNG

Je **100 µl Positiv- und Negativkontrolle**
bzw. **1:11 verdünnte Kotproben**
in je eine Vertiefung pipettieren.

Je **100 µl Konjugat 1**
in jede Vertiefung pipettieren. Mischen.

Zugedeckt **30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** inkubieren.

5× unter leichtem Schwenken mit **je 300 µl Waschpuffer waschen**.

Je **100 µl Konjugat 2**
in jede Vertiefung pipettieren.

Zugedeckt **15 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** inkubieren.

5× unter leichtem Schwenken mit **je 300 µl Waschpuffer waschen**.

Je **100 µl Substrat (TMB)**
in jede Vertiefung pipettieren.

Zugedeckt **15 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**
im Dunkeln inkubieren.

Je **50 µl Stopp-Reagenz**
in jede Vertiefung pipettieren.

Photometrische Auswertung der Vertiefungen bei 450 nm.

Optional: Referenzwellenlänge 620 nm.

Nullabgleich gegen Luft.

1. INTRODUCTION

Giardia is known to be one of the most common enteritic parasites in pocket pets, pets, farm and wild animals as well as in humans (zoonosis) world-wide. The species *Giardia duodenalis* occurs in the different animal species and humans in varying genotypes (genotypes A to G), which differ in their infection and their host spectrum. Types A and B have zoonotic potential, whereas the others are more or less host-specific. Newborns and young animals are mostly affected. Prevalences vary in cats and dogs, depending on age (> 70% under 1 year), husbandry (10% in single husbandry up to 100% in breedings and animal shelters) and immune status. Transmission (direct contact, by contaminated food, water, objects, grooming and vectors like flies etc.) happens fecal-orally by ingestion of highly infectious and very resistant cysts being discharged by other animals or humans. Only five to ten cysts are enough to cause an infection.

G. duodenalis has an asexual life cycle. In the duodenum of the infected animals, two growth forms, so-called trophozoites, emerge from the incorporated cysts (excystment). These multiply by duplication and attach via suckers to the duodenal surface. Free trophozoites turn into their lasting forms, the cysts (encystment), especially in the ileum. These are excreted in large amounts (10⁷/g feces) and mostly intermittent, i.e. not with every defecation. The prepatent period averages 5 to 16 days.

The main symptom of giardiasis is diarrhoea, more or less intensive, that can run from symptomatic (acute, chronic, self-limiting, periodic-intermittent or continuous) to asymptomatic. Independent on the progression, cysts and/or trophozoites can be excreted (primarily with strong diarrhoea). *Giardia* cysts can be differentiated from cysts of different coccidia species only by microscopical experienced people. This is similarly true for *Giardia*- and *Tritrichomonas foetus* trophozoites.

Numerous studies show the advantages of the enzyme immunoassay for the qualitative detection of *Giardia duodenalis* compared with conventional detection methods for *Giardia* like the microscopic proof of cysts and/or trophozoites in the direct fecal smear or after enrichment by flotation or in the modified sedimentation ("MIFC method") or even via intestine biopsy.

Based on its high sensitivity and specificity, the **MegaELISA® GIARDIA** perfectly fits as standard test for veterinary laboratories for the fast and standardised routine test of intact *G. duodenalis* cysts, trophozoites and their disintegration products.

2. INTENDED USE

MegaELISA® GIARDIA is an enzyme immunoassay for the qualitative detection of *Giardia duodenalis* surface antigens in the feces of pocket pets, pets and farm animals.

3. TEST PRINCIPLE

In the **MegaELISA® GIARDIA**, specific antibodies are applied in a sandwich principle. Monoclonal antibodies against specific *Giardia* antigens are bound to the surface of the well in the ELISA plate. A suspension of the feces sample to be tested as well as internal controls are incubated in a first step at room temperature (20–25°C) with biotinylated anti-*Giardia* antibodies (Conjugate 1) in the wells of the ELISA plate. During presence of *Giardia* antigens, a sandwich complex results, consisting of immobilised antibodies, the *Giardia* antigen and the biotinylated antibody. After a wash step, Streptavidin poly-peroxidase conjugate (Conjugate 2) is added and incubated again at room temperature (20–25°C). Non-bound Streptavidin poly-peroxidase conjugate is removed in another wash step. After addition of Substrate, the bound enzyme changes the colourless solution in the wells of the ELISA plate with positive samples into a blue solution. By addition of Stop solution, the colour changes from blue to yellow. The extinction is proportional to the concentration of *Giardia* antigens present in the sample.

4. TEST-KIT COMPONENTS

4.1. REAGENTS / COMPONENTS PROVIDED WITH THE TEST-KIT

The reagents of one package are sufficient for 96 determinations.

	96's kit	Content
1.	12 separable strips	ELISA plate with separable microtitre strips in holding frame with 8 determinations each, coated with monoclonal antibodies against <i>G. duodenalis</i>
2.	100 ml	Sample dilution buffer (SDB, protein buffered NaCl solution, blue stained), ready to use, white cap
3.	100 ml	Wash buffer (10× phosphate buffered NaCl solution, contains 0.1 % thimerosal), brown cap
4.	2 ml	Positive Control (inactivated <i>G. duodenalis</i> antigen), ready to use, red cap
5.	2 ml	Negative Control , ready to use, blue stained, white cap
6.	13 ml	Conjugate 1 (monoclonal Biotin conjugated anti- <i>G. duodenalis</i> antibody in stabilised protein solution, red stained), ready to use, orange cap
7.	13 ml	Conjugate 2 (Streptavidin poly-peroxidase conjugate in stabilised protein solution), ready to use, orange stained, white cap
8.	13 ml	Substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine [TMB]/H ₂ O ₂), ready to use, blue cap. Do not expose to sun light.
9.	12 ml	Stop solution (1 M Sulfuric acid), ready to use, yellow cap

	96's kit	Content
10.	1	Cover foil
11.	1	Evaluation sheet
12.	1	Instructions for use

4.2. REQUIRED, NON-PROVIDED REAGENTS / DEVICES

- Distilled or deionised water
- Disposable sample tubes
- Disposable plastic pipettes
- Laboratory pipette (range between 5 and 1000 μ l)
- Vortex mixer
- Filter paper/laboratory cloths
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Stop watch
- Washing station for ELISA plates or multichannel pipette (300 μ l)
- Photometer for ELISA plates (450 nm, possibly reference filter 620)
- Waste bin with a 0.5% hypochlorite solution

5. STABILITY AND STORAGE



2-8°C

Store at
2-8°C



Expiry date
– see label



For veterinary use
only



Lot number



In vitro diagnosticum



Do not use test-kit
components from
different kits, lot
numbers or beyond
stated expiry date.



Follow instructions for
use precisely

- Microbial contamination must be avoided. After the expiration date, the guarantee of quality is not provided.
- When opening the sealed aluminium pouch with the ELISA plate, care must be taken that the reclosable clip closure is not damaged or even separated.
- A direct influence of light onto the colourless Substrate must be absolutely avoided to prevent degradation or colour change to blue by autooxidation. If the Substrate has changed to blue, it cannot be used any more (functional incapacity).

6. INFORMATION ON THE SAMPLE MATERIAL

- Fecal samples of pocket pets, pets and farm animals can be used.
- Keep in mind that the sample material, as well as all used test-kit components, should have reached room temperature at the time of application.
- For the test, the required amount of feces as described in issue 7.3/Sample preparation, is needed. The amount depends on the consistency of the sample.
- Care must be taken that the fecal samples are collected in adequate transport tubes. Contact of the feces sample with transport media, preservatives, animal sera, metal ions, oxidising agents or detergents should be avoided, because these can lead to interferences with the **MegaELISA® GIARDIA**. When rectal smears should be used, take care that enough feces sample material (minimum 100 mg) is present for the test procedure.
- Due to the normally inhomogeneous or nest-like dissemination of antigens in the feces, the specimen material has to be mixed up homogeneously (spatula, vortex-mixer) before sampling.
- Non-cooled (20–25°C), the sample should be tested within 4 hours. At 2–8°C, the sample can be stored up to 3 days, permanently at minimum –20°C. Thawing and freezing for several times must be avoided. Thawed samples are to be mixed homogeneously before dilution (optimally with vortex mixer).
- During investigations of larger animal groups (same stable/household), feces samples of clinical inapparent animals/contact animals also should be tested to identify asymptomatic carriers.

7. TEST PREPARATION

! Read instructions for use carefully before starting the test. For the reliability of the results, it is important to follow the instructions for use exactly as described. Carry out the test in the given order and without delay. Use clean disposable tips for each pipetting step.

7.1. GENERAL

- Remove the microtitre strips from the aluminium pouches after they have reached room temperature. To avoid loss by evaporation, it is advisable to cover or mask them. Immediately return non-used microtitre strips into the pouch, close the pouch and store it at 2–8°C.
- Mix the reagents well immediately before their use.
- After use, reagents should be stored at 2–8°C again.
- Microtitre strips that were once used cannot be used again.
- Damaged test-kit components must not be used.
- Direct contact of samples with the test-kit components has to be avoided (cross-contamination).
- Direct solar radiation during testing must be avoided.

7.2. PREPARATION OF WASH BUFFER 1:10

Mix 1 part of the Wash buffer concentrate with 9 parts of distilled water. When crystals are visible in the Wash buffer concentrate, dissolve these by warming the Wash buffer concentrate in a water bath at 37°C. The diluted buffer will be stable for 4 weeks when stored at 2–8°C.

7.3. SAMPLE PREPARATION / SAMPLE DILUTION 1:11

- Add 1 ml (1000 µl) **MegaELISA® GIARDIA** Sample dilution buffer (SDB) into an appropriate sample tube.
- Aspirate ca. 100 µl of liquid feces with a disposable plastic pipette or take ca. 50–100 mg of pulpy-compact feces with a spatula or disposable inoculation loop and add the sample into the SDB.
- Homogenise the sample-buffer mixture (SBM) well (repeated mixture with the pipette or vortex mixer). Leave the sample to rest for a short time to allow coarse feces particles to settle/sediment.
- The supernatant won hereof can be directly used for the test.
- **ATTENTION:** During the use of an ELISA washing station, the supernatant must be free of particles. To guarantee this, centrifuge the SBM at 2500 g for 5 minutes.
- Controls are ready to use and need not be diluted.

8. TEST PROCEDURE

- Mix sample material well before application.
- **It is recommended to test controls and samples in duplicates.**
- Before beginning, the position of the patient samples and the Controls in the microtitre strips must be determined on the Evaluation sheet supplied with the kit.

8.1. SAMPLING AND FIRST INCUBATION

- Place the required amount of test strips into the holding frame.
- Add **100 µl** each of
 - **Positive Control**
 - **Negative Control**
 - **diluted samples (SBM)**in the desired order into the particular cavity of the microtitre strip.
- Add **100 µl of Conjugate 1** (Biotin conjugated antibody) into each cavity and **mix** the suspensions by tipping softly at the plate rim.
- Cover the ELISA plate and incubate for **30 minutes at room temperature (20–25°C)**.

8.2. WASHING – CAREFULLY and STRICTLY FOLLOWING THE INSTRUCTIONS!

MANUAL WASHING

- Remove the incubation solution by emptying into a waste bin with hypochlorite. Disposal must be made according to official regulations.
- Beat the ELISA plate carefully several times onto filter paper/laboratory cloth.

- Wash 5× with 300 µl wash buffer per cavity. Shake plate with wash buffer slightly, then beat it.
- **Drain completely between each wash step, then beat carefully several times on a dry unused spot.**
- Before the last beating, take care that the reagent for the next pipetting step is prepared.

AUTOMATICAL WASHING

- **ATTENTION:** SBM still containing any particles should be manually removed from the cavities by shaking off (danger of blockage of the washing needles).
- Observe correct setting of the washing station (5×300 µl).
- To reach optimal washing results use at least 300 µl Wash buffer per cavity and wash step.
- Aspire liquid completely after each wash step.
- After the final wash step, beat the plate carefully but thoroughly on filter paper/laboratory cloth. There should not be any residual moisture in the cavities.

8.3. SECOND INCUBATION

- Add **100 µl Conjugate 2** (Streptavidin poly-peroxidase conjugate) into each cavity of the ELISA plate.
- Cover the ELISA plate and incubate for **15 minutes at room temperature (20–25°C)**.

8.4. WASHING

- Wash as described in issue 8.2.

8.5. THIRD INCUBATION

- Add **100 µl Substrate (TMB)** into each cavity of the ELISA plate.
- Cover the ELISA plate and incubate for exactly **15 minutes at room temperature (20–25°C) and in the dark.**
- Add **50 µl Stop solution** into each cavity, in the same order and at the same rate as for the TMB substrate solution.

8.6. MEASUREMENT

- After careful mixing (tipping softly at the plate rim), the extinction can be measured at 450 nm. An additional measurement at the reference wavelength 620 nm is recommended.
- Adjust the ELISA Plate Reader to zero against air – without ELISA plate.
- If duplicates or multiple determinations were done, calculate the mean **extinction values.**
- **ATTENTION:** Strongly positive samples can cause blackish precipitates of the Substrate. Pre-dilution of the sample with physiological NaCl solution, for example 1+1, is recommended. Then multiply the extinction values by 2.

9. TEST EVALUATION

9.1. REAGENT STABILITY – INTERNAL QUALITY CONTROL

During each testing, Positive and Negative Controls should be performed to ensure the stability of reagents as well as the correct test procedure.

The test was correct, when following reference values were reached:

- **Negative Control** (450 nm) **OD < 0.2** or (450/620 nm) **OD < 0.160**
and

- **Positive Control** (450 nm or 450/620 nm) **OD > 0.8**

If the OD of the negative control is 450 nm > 0.2 (450/620 nm OD > 0.160), the washing process was probably insufficient.

A variation of the required values as well as any clouding or blue staining of the colourless Substrate before adding into the cavities can be a hint on expiry of reagents. If the prescribed issues are not fulfilled, following should be ensured before test repetition:

- Stability of the used reagents
- Functionality of the used machines (calibration)
- Visual control of the test-kit components for contamination or leakage; a blueish stained Substrate solution should not be used.

9.2. CUT-OFF

For determination of the Cut-off, 0.15 extinction units are added to the measured extinction of the Negative Control.

Cut-off = Extinction of Negative Control + 0.15

9.3. EVALUATION OF TEST RESULTS

Positive test result

Sample with an extinction more than 10 % above the calculated Cut-off.

Marginal test result

Sample with an extinction in the field of 10 % above and below the calculated Cut-off. A repetitive test with a new sample being marginal, too, should be evaluated as negative.

Negative test result

Sample with an extinction more than 10 % below the calculated Cut-off.

9.4. INTERPRETATION OF THE TEST RESULTS

- The 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, symptoms as well as serological data.
- Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the extinction values.
- The **MegaELISA® GIARDIA** detects antigens of *Giardia duodenalis* in the feces of pocket pets, pets and farm animals. A relationship between the magnitude of a detected value and the onset or severity of clinical symptoms can not be deduced therefrom.

- A positive result does not exclude the presence of other infectious agents.
- A negative result does not exclude a possible *Giardia* infection. In case of existing diarrhoea problem and one-time negative test, a new test with a new feces sample (optimally collection feces sample: individual testing of at least three consecutive feces samples) should be carried out within 7 days.
- A marginal test result can be caused by an inhomogeneous distribution of the *Giardia* in the feces sample. In this case, a second suspension from the same feces sample should be tested, or a further feces sample should be requested for examination.

10. SAFETY MEASURES AND PRECAUTIONS

- Wear safety clothes (disposable gloves, lab coat, safety glasses) and wash the hands after finishing the test procedure.
 - No eating, drinking and smoking during test procedure.
 - The sample material and Controls must be seen as potentially infectious and disposed of accordingly after test procedure, together with the used test-kit components.
 - Do not use reagents of other manufacturers together with the reagents of this test-kit.
 - Do not mix reagents of different Lot numbers.
 - Do not change the caps of the individual reagents among each other.
 - Close bottles immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
 - After first opening, the reagent bottles must be checked for microbial contamination before reusing.
 - Wash buffer contains Thimerosal as preservative.
 - Stop solution contains 1 M Sulfuric acid. Sulfuric acid irritates eyes and skin. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor. Keep out of the reach of children.
 - Substrate solution contains Hydrogen peroxide.
- Absolutely avoid eye, skin or mucosa contact.**
- **ATTENTION:** Liquid waste containing Stop solution must be neutralised prior to addition to a hypochlorite solution.
 - Only use clean pipette tips, dispenser and laboratory material.
 - Never pipet with your mouth.
 - Label sample material and associated sample tube to ensure a precise assignment.
 - Use a new sample tube for each sample.
 - During the incubation and wash steps, the cavities must be completely covered with liquid.
 - The cavities of the ELISA plate must not stay empty longer as necessarily required.

- To avoid cross contamination and falsely elevated rest result, pipet the patient samples and Conjugate carefully into the cavities of the ELISA plate.
- **MegaELISA® GIARDIA** is only provided for the use of qualified staff that knows the work technique objectionable.

The test procedure, the information, the safety measures and warnings in the Instructions for use are to be followed strictly. For use of the test-kit in diagnostical instruments, the test method has to be validated. Each change in appearance, composition and the test procedure as well as each use in combination with other products not authorised by the manufacturer is not permitted; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents being associated herewith. No liability is accepted for false test results due to visual evaluation.

11. LIABILITY

The entire risk of liability in connection with the use of this product remains with the purchaser. The manufacturer is not liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the usage, test performance and evaluation of this product.

12. SHORT PROTOCOL MegaELISA® GIARDIA

TEST PREPARATION

Warm needed test strips and reagents to **room temperature (20–25 °C)**.

Dilute Wash buffer 1:10 with distilled water.

Dilute feces samples 1:11 with Sample dilution buffer (100 µl feces + 1000 µl SDB)

TEST PROCEDURE

Add **100 µl of Positive and Negative Controls**
or **1:11 diluted feces samples**
each in a cavity.

▼
Add **100 µl of Conjugate 1**
in each cavity. Mix carefully.

▼
Cover and incubate **30 minutes at room temperature (20–25 °C)**.

▼
Wash 5× with soft shaking with **300 µl Wash buffer each**.

▼
Add **100 µl of Conjugate 2**
in each cavity. Mix carefully.

▼
Cover and incubate **15 minutes at room temperature (20–25 °C)**.

▼
Wash 5× with soft shaking with **300 µl Wash buffer each**.

▼
Add **100 µl of Substrate**
in each cavity. Mix carefully.

▼
Cover and incubate **15 minutes at room temperature (20–25 °C)**
in the dark.

▼
Add **50 µl of Stop solution**
in each cavity.

▼
Photometric evaluation of the cavities at 450 nm.

Optional: Reference wave length 620 nm.

▼
Adjustment against air.

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES