

GIARDIA II™

A Monoclonal ELISA for Detecting *Giardia lamblia* Antigen
in Fecal Specimens

Catalog No. 30405 (96 Tests)

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

ESPAÑOL p. 8

Un ELISA Monoclonal para Detectar el Antígeno de
Giardia lamblia en Muestras Fecales
No. De catálogo 30405 (96 Pruebas)

IVD Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

DEUTSCH p. 15

Ein Monoklonaler ELISA Test zum Nachweis von
Giardia lamblia in Stuhlproben
Katalognummer 30405 (96 Tests)

IVD In-Vitro-Diagnostikum

FRANCAISE p. 22

Un ELISA Monoclonal pour la détection de l'antigène de
Giardia lamblia dans les specimens fécaux
Numéro de Catalogue 30405 (96 Analyses)

IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

Made in the USA

Developed and Manufactured by:



2001 Kraft Drive

Blacksburg, VA 24060-6358 USA



Distributed by:



Alere North America, LLC
30 South Keller Road
Orlando, Florida 32810
TEL 1-877-441-7440
1-321-441-7200 OUTSIDE USA

GIARDIA II™

INTENDED USE

The *GIARDIA II*™ test is an enzyme immunoassay for the qualitative detection of *Giardia lamblia* cyst antigen in human fecal specimens. It is indicated for use with fecal specimens from patients with diarrhea to determine the presence of *G. lamblia* gastrointestinal infection. This test can be used for fecal specimens submitted for routine clinical testing from adults or children.

EXPLANATION

Giardia is a binucleated flagellated protozoan parasite which exists in two forms: a noninfectious, pear-shaped trophozoite (9 to 20 µm) inhabiting the small intestine and the highly infectious cyst form which is elliptical in shape and ranges in size from 8 to 12 µm (1). Survival outside its host varies greatly between the two forms: the trophozoite which is extremely labile, lasts only a matter of hours outside the body, while the cyst form may survive for several days in an external environment (1). The parasite is responsible for infections due to water contamination and travelers have been found to contract giardiasis from endemic areas (2-5). Transmission also occurs by direct contact especially by asymptomatic carriers and by food contamination (6,7). High-risk categories include young children, immunocompromised patients and those without previous exposure (8). More recently, giardiasis has become a common sexually transmitted disease (9).

Giardia has been found in all animal hosts studied and animal fecal contamination especially of water is another route of transmission in humans (4,10,11). Clinical manifestations of giardiasis range from asymptomatic carriage with the passing of cysts to chronic debilitating diarrhea, weight loss and malabsorption (8,12,13). Diagnosis by microscopy has been the most common method used for giardiasis. However, this procedure requires extensive experience and the presence of intact cysts in the feces. An alternative test is the ELISA. This procedure is fairly simple to perform and exhibits increased sensitivity compared to microscopic examination. Fecal specimens are examined using various techniques (14) and accuracy of results are dependent on the skill of the technician. The success rate of fecal examination varies between 50 and 70% (15,16) and several specimens are usually necessary to establish a diagnosis. Giardiasis also may be present in the absence of whole organisms and can be confused with other illnesses such as Crohn's disease and ulcerative colitis (17). When infection is present but parasites are not detected, sampling and testing of duodenal fluid may detect trophozoites, but this method is invasive and expensive (14,16). Detection of the organism and antigens by ELISA provides an alternative method of establishing a diagnosis and is sensitive and specific (18-20). Large numbers of specimens can be tested rapidly and objectively, and the procedure is less labor intensive than some microscopy methods.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The *GIARDIA II*™ test uses monoclonal and polyclonal antibodies to a cell-surface antigen of the organism. The *Microassay Plate* in the kit contains immobilized monoclonal antibody and the *Conjugate* consists of polyclonal antibody, both of which are specific for the cell-surface antigen. In the assay, an aliquot of a diluted fecal specimen is transferred to a microassay well. The immobilized monoclonal antibody binds the *Giardia* antigen if the antigen is present. Upon addition, *Conjugate* then binds to the antigen/antibody complex. Any unbound materials are removed during the washing steps. Following the addition of substrate, a color is detected due to the enzyme-antibody-antigen complexes that formed in the presence of *Giardia* antigen and *Conjugate*.

MATERIALS PROVIDED

CONJ **ENZ**

Conjugate, 7 mL (Rabbit polyclonal antibody to a cell-surface antigen of *Giardia* in a protein buffered solution containing 0.02% Thimerosal)*

DIL **SPE**

Diluent, 50 mL (Buffered protein solution containing 0.02% Thimerosal)*. The *Diluent* is also to be used as the negative control solution (see TEST PROCEDURE).

H₂SO₄ 0.6N**Stop Solution**, 7 mL (0.6N sulfuric acid). Caution: Avoid contact with skin.

Flush with water immediately if contact occurs.

Signal Word: Danger

H314: Causes severe skin burns and eye damage

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

**CONTROL +****Positive Control**, 3.5 mL (*Giardia* antigen in a protein buffered solution containing 0.02% thimerosal)***SUBS REAG****Substrate**, 14 mL (solution containing tetramethylbenzidine and peroxide)**WASHBUF 20X****Wash Buffer Concentrate**, 50 mL (20X concentrate containing phosphate-buffered saline, detergent and 0.2% thimerosal)*

Signal Word: Warning

H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure P260, P314, P501

**MA PLT****Microassay Plate**, 12 strips, each consisting of 8 wells coated with monoclonal antibody to *Giardia* cell-surface antigen (stored with desiccant)**2 plastic adhesive sheets****100 graduated disposable pipettes**

*contains mercury

**MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

Squirt bottle for wash reagent

950 mL distilled water for diluting wash reagent

Absorbent paper

Applicator sticks

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

Vortex mixer

Discard container

Microcentrifuge tubes

PRECAUTIONS

1. For *in vitro* diagnostic use only.
2. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use a kit past the assigned expiration date.
3. Reagents should be at room temperature before use.
4. Caps and tips are color-coded; do not mix.
5. Each component in the kit should be inspected for any signs of leakage. Upon arrival, the kit should be inspected to ensure that components are not frozen or warm-to-the touch due to improper shipping conditions.
6. When handling assay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
7. Hold dropper bottles vertically to ensure proper drop size.
8. Unused microassay wells must be placed back inside of the resealable pouch with the desiccant to protect them from moisture.
9. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
10. The *Substrate* is light sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources.
11. Optimal results are obtained by following the specified test procedure. The concentrations, incubation conditions, and processing specifications have been optimized for sensitivity and specificity. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test.
12. Handle specimens and used microassay wells as if capable of transmitting infectious agents. Wear disposable gloves when doing the test.
13. The *20X Wash Buffer Concentrate* contains 0.2% Thimerosal as a preservative. Once diluted to normal use concentration this solution is classified as non-hazardous. The *Stop Solution* contains 0.6N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact occurs. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. Handle reagents according to existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice.

Safety Data Sheets for this product are available upon request, contact technical support.

14. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations. Do not place in trash, dispose of as hazardous waste.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is given on the label. Expiration dates for each component are listed on individual labels. The kit should be stored between 2° and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

SPECIMEN HANDLING

1. Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens for culture are appropriate. No modification of collection methods used for standard microscopic O&P examinations is needed. Fecal specimens may be used as unpreserved or frozen, or in preservation media of 10% buffered formalin or Sodium Acetate Formalin (SAF).
2. Unpreserved specimens should be kept between 2° and 8°C and tested within 24 hours of collection. Specimens that cannot be tested within this time should be stored at -20°C or less until tested.
3. Preserved specimens may be kept at room temperature and tested within 18 months of collection.
4. Concentration steps are not needed (or recommended) for fecal specimens.
5. Make sure that specimens are thoroughly mixed (vortexed) prior to performing the test. This includes complete mixing of the specimen prior to transfer to the *Diluent* and/or microassay well.
6. All dilutions must be made with *Diluent*.

REAGENT PREPARATION

1. The contents of the kit should be brought to room temperature before use.
2. Prepare 1X *Wash Solution*. The *Wash Buffer Concentrate* is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed). It should be diluted to a total volume of 1 liter by adding 50 mL of the concentrate to 950 mL of distilled water. The 1X *Wash Solution* can be stored between 2° and 8°C.

SPECIMEN PREPARATION

1. **Fresh/Frozen Fecals:** Frozen fecal specimens should be thawed. Add 400 µL of *Diluent* to a microcentrifuge tube (one per sample), then add 100 µL (2nd graduation mark on pipette) of sample to the tube and mix well. This is a 1:5 dilution. If the specimen cannot be pipetted, use an applicator stick to transfer approximately 0.1 gram of feces. This is about the size of a small pea (about 4 mm in diameter). Perform final dilution in microassay wells as directed in the PROCEDURE.
2. **Preserved Fecals:** Mix (vortex) contents of container thoroughly before transferring specimen. No further processing or dilution is necessary. Perform final dilution in microassay wells as directed in PROCEDURE.

PROCEDURE

1. Two control wells must be used each time the test is performed. These wells serve as positive and negative controls. One well is needed for each test run. Hold the dropper bottles vertically when adding the drops. Identification marks may be written directly on side of well. Add 1 drop (50 µL) of the *Positive Control* (black cap) to the positive control well and 2 drops (100 µL, 2nd graduation mark on transfer pipette) of the negative control (i.e., *Diluent*) to the negative control well.
2. If fresh or frozen samples (i.e. unpreserved) are to be used, make a 1:5 dilution of the sample as stated in SPECIMEN PREPARATION above.
3. Transfer 100 µL of *Diluent* to each test well of the *Microassay Plate*. Using plastic pipettes, transfer 1 drop (50 µL, 1st graduation mark on pipette) of sample (preserved or

diluted as above) to each test well already containing *Diluent* and gently tap the wells to mix. Seal with a plate sealer and incubate 1 hour at room temperature.

4. Shake out contents of assay wells into a discard pan. Wash each well using the 1X *Wash Solution* in squirt bottle with fine-tipped nozzle, directing the *Wash Solution* to the bottom of the well with force. Fill the wells, shake the wash solution out of the well into a discard pan and slap the plate hard onto a dry paper towel. Repeat the washing step 3X (for a total of 4 washes). If any fecal material remains in the wells wash the plate until it appears clean.
5. After washing, completely remove any residual liquid in the wells by striking the plate onto a dry paper towel until no liquid comes out. Dispose of paper towels and specimen containers properly.
6. Add 1 drop (50 μ L) of *Conjugate* (red cap) to each well and gently tap to mix. Seal with a plastic adhesive sheet. Incubate the wells for 30 minutes at room temperature.
7. Repeat the washing procedure (Steps 4 and 5).
8. Add 2 drops (100 μ L) of *Substrate* (blue cap) to each well. Gently tap the wells to mix. Incubate the wells at room temperature for 10 minutes.
9. Add 1 drop (50 μ L) of *Stop Solution* (yellow cap) to each well. Gently tap the wells and wait 2 minutes before reading. The addition of the *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color, which may be quantitated by measuring the absorbance at 450 nm on a microplate ELISA reader. The instrument should be blanked against air. Wipe the underside of each well before measuring the absorbance. If a dual reader is used, blank against air at 620 nm and read at 450 nm. Visual readings should be noted. Read within ten minutes after adding *Stop Solution*.

QUALITY CONTROL

1. A positive and a negative control must be run with each series of test specimens.
2. Each positive control well should be an easily visible yellow color and should give an absorbance of 0.500 or higher. Any well that gives a positive reading without visible color should be repositioned, wiped on the underside of the well, and read again.
3. Negative control wells should be colorless or they may have a faint yellow color but they must have an absorbance value of <0.150 when read on single wavelength (OD_{450nm}) or <0.090 when read on dual wavelength (OD_{450/620nm}).
4. Test results are not valid unless the performance characteristics of the positive and negative controls are met. If these results are not observed, call Technical Services.
5. Test results along with control absorbance values should be recorded and reported according to in-house procedures and should be stored according to in-house procedures for future reference.

INTERPRETATION OF RESULTS

Absorbance		Visual Color	Interpretation
450 nm	450/620 nm		
<0.150	<0.090	Clear to slight yellow	Negative - Below detectable limits of assay
≥ 0.150	≥ 0.090	Pale yellow to strong yellow	Positive - Specimen contains <i>Giardia</i> antigen

Visual Interpretation

Negative: Any sample that is colorless or resembles the negative control well in intensity of color.

Positive: Any sample that is obviously more yellow than the negative control well.

NOTE: The negative control, as well as some test wells, may show some slight yellow color. A sample well must be obviously more yellow than the negative control well to be called a positive result.

Spectrophotometric Interpretation

- 1. Determine the absorbance value of the negative control. The negative control reading should be < 0.150 OD₄₅₀ or < 0.090 OD_{450/620}. If not, the test is invalid and should be repeated, paying attention to the wash procedure.
- 2. The reading for the *Positive Control* should be ≥0.500.
- 3. Test results
Negative: < 0.150 (absorbance at 450 nm) or < 0.090 (absorbance at 450/620 nm)
Positive: ≥0.150 (absorbance at 450 nm) or ≥0.090 (absorbance at 450/620 nm)

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 1. The *GIARDIA II*TM test detects the presence of *Giardia* antigen in fecal specimens. This antigen is present primarily in the cyst form of the parasite.
- 2. The test results should be interpreted by a physician in consideration of other laboratory results and clinical history.
- 3. Concentrated fecal specimens should not be tested in the *GIARDIA II*TM test and will not give accurate results.
- 4. The predictive value of a positive result decreases when testing in a low prevalence population.
- 5. The *GIARDIA II*TM test is for the qualitative detection of *Giardia* antigen in fecal specimens. It has not been evaluated for quantitative determinations of organism load, and the magnitude of the absorbance value does not correlate with organism load.

EXPECTED VALUES

Normal healthy individuals should not be infected with *Giardia* and should test negative in the *GIARDIA II*TM test. A positive test result in the *GIARDIA II*TM test indicates that the person is shedding detectable amounts of *Giardia* antigen. The incidence of *Giardia* infection varies significantly between populations and geographic regions. Children in daycare settings have exhibited higher rates of infection with *Giardia* than the normal population (21). In addition, homosexual men have shown higher rates of infection (22).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In a study performed at TECHLAB, Inc. the *GIARDIA II*TM test was evaluated using fresh fecal specimens and fecal specimens preserved in 10% Formalin or SAF. Specimens used in the study were identified as *Giardia*-positive by microscopy at outside laboratories. The positive specimens were from patients ranging from age three to eighty-nine. Of 203 specimens analyzed, 110 were determined to be positive by microscopy. The *GIARDIA II*TM test detected all 110 of the positive specimens. A total of 93 *Giardia* negative specimens were tested. All of the 93 *Giardia* negative specimens were negative in the *GIARDIA II*TM test. The results are shown in Table 1.

Table 1. Comparison of the *GIARDIA II*TM test with microscopy (n = 203).

		Microscopy	
		+	-
<i>GIARDIA II</i> TM	+	110	0
	-	0	93

Sensitivity	100%
Specificity	100%
Predictive Positive Value	100%
Predictive Negative Value	100%
Correlation	100%

In an additional in-house study, the *GIARDIA II*TM test was compared to another commercially available ELISA using fresh fecal specimens and fecal specimens preserved in 10% formalin or SAF. Specimens used in the study were identified as *Giardia*-positive by microscopy by outside laboratories. Of 128 specimens analyzed, 88 were determined to be positive by microscopy. The *GIARDIA II*TM test detected all 88 of the positive specimens while the other commercially available ELISA detected 86 of the 88 positive specimens. A total of 40 negative specimens were tested. All 40 of the *Giardia*-negative specimens were negative in both the *GIARDIA II*TM test and the other commercially available ELISA. The results are shown in Table 2.

Table 2. Comparison of another commercial ELISA and *GIARDIA II*TM test with microscopy (n = 128).

		Microscopy	
		+	-
Other Commercial ELISA	+	86	0
	-	2	40

		Microscopy	
		+	-
<i>GIARDIA II</i> TM	+	88	0
	-	0	40

	Other Commercial ELISA	<i>GIARDIA II</i> TM
Sensitivity	97.7%	100%
Specificity	100%	100%
Predictive Positive Value	100%	100%
Predictive Negative Value	95.2%	100%
Correlation	98.4%	100%

CROSS-REACTIVITY

The *GIARDIA II*TM test was evaluated using fecal specimens found to be positive for a variety of intestinal pathogens. No cross-reactivity was observed with fecal specimens that contained any of the pathogens listed below. The number of specimens tested with each organism is shown in parenthesis.

<i>Ascaris lumbricoides</i> (2)	<i>Blastocystis hominis</i> (8)	<i>Chilomastix mesnili</i> (2)
<i>Clonorchis</i> (1)	<i>Cryptosporidium parvum</i> (8)	<i>Dientamoeba fragilis</i> (3)
<i>Endolimax nana</i> (3)	<i>Entamoeba coli</i> (4)	<i>Entamoeba hartmanii</i> (2)
<i>Entamoeba histolytica</i> (2)	Hookworm (2)	<i>Iodamoeba butchlii</i> (2)
<i>Isospora belli</i> (2)	Rotavirus (11)	<i>Schistosoma mansoni</i> (2)
<i>Strongyloides stercoralis</i> (3)	<i>Trichuris trichiura</i> (2)	

PRECISION - INTER-ASSAY

For the determination of inter-assay performance, four positive and four negative fecal specimens were assayed a total of five times over a five day period in the *GIARDIA II*TM test. The % Coefficient of Variation (CV) of positive specimens ranged from 3.5 to 8.0, with an average of 5.2. The % Coefficient of Variation (CV) of negative specimens ranged from 3.4 to 14.9, with an average of 8.3.

PRECISION - INTRA-ASSAY

The intra-assay % Coefficient of Variation (CV) was determined by analyzing four positive and four negative fecal specimens. Each specimen was assayed in twelve test wells. The % Coefficient of Variation (CV) of positive specimens ranged from 2.9 to 11.4, with an average of 7.1. The % Coefficient of Variation (CV) of negative specimens ranged from 7.9 to 36.9, with an average of 22.8.

INDICACIÓN DE USO

La prueba *GIARDIA II™* es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa del antígeno quístico de *Giardia lamblia* en muestras fecales humanas. Esta prueba está indicada para ser utilizada en muestras fecales de pacientes con diarrea para determinar la presencia de una infección gastrointestinal por *Giardia lamblia*. Esta prueba puede ser usada en especímenes fecales de adultos o niños que han sido enviados para pruebas clínicas de rutina.

EXPLICACIÓN

Giardia es un parásito protozoario flagelado binucleado que existe en dos formas: el trofozoito no infeccioso con forma de pera (9 a 20 µm) que habita el intestino delgado, y la forma quística, altamente infecciosa, que tiene forma elíptica y un rango de tamaño entre 8 a 12 µm (1). La sobrevivencia fuera del huésped presenta gran variación entre las dos formas: el trofozoito que es extremadamente lábil, dura sólo un par de horas fuera del cuerpo, mientras que el quiste puede sobrevivir por varios días en el medio ambiente externo (1). El parásito es responsable de infecciones debido a la contaminación del agua y se ha encontrado que viajeros contraen Giardiasis en áreas endémicas (2-5). También ocurre la transmisión vía el contacto directo especialmente a través de los portadores asintomáticos y de la contaminación del alimento (6,7). Las categorías de alto riesgo incluyen a niños pequeños, pacientes inmuno comprometidos y a personas sin exposición previa (8). Recientemente, la Giardiasis se ha convertido en una frecuente enfermedad de transmisión sexual (9).

Giardia ha sido encontrada en todos los huéspedes animales estudiados y la contaminación con fecas animales, especialmente del agua, es otra ruta de transmisión a los humanos (4,10,11). Los signos clínicos de Giardiasis varían desde portadores asintomáticos con eliminación de quistes, hasta la diarrea crónica debilitante con pérdida de peso y mala absorción (8,12,13). El diagnóstico microscópico ha sido el método más comúnmente utilizado para la Giardiasis. Sin embargo, este procedimiento requiere de vasta experiencia y de la presencia de quistes intactos en las fecas. Una prueba alternativa es el ELISA. Este procedimiento es de ejecución relativamente simple y presenta una elevada sensibilidad comparado con el examen microscópico. Las muestras fecales son examinadas utilizando diversas técnicas (14) y la exactitud de los resultados dependen de la habilidad del técnico. La tasa de éxito del examen fecal varía entre el 50% y el 70% (15-16) y usualmente se requieren varias muestras para establecer un diagnóstico. La Giardiasis también puede estar presente en ausencia de organismos enteros y puede ser confundida con otras enfermedades tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa (17). Cuando la infección está presente pero no se detectan parásitos, el muestreo y análisis del fluido duodenal puede detectar trofozoítos, pero este método es invasivo y costoso (14-16). La detección del organismo y de antígenos mediante ELISA constituye un método alternativo para establecer el diagnóstico que es sensible y específico (18-20). Se pueden analizar muchas muestras en forma rápida y objetiva, y el procedimiento requiere de menos trabajo que algunos de los métodos microscópicos.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

La prueba *GIARDIA II™* utiliza anticuerpos monoclonales y policlonales contra un antígeno de la superficie celular del organismo. La *Placa de Microensayo* del kit, contiene inmovilizados anticuerpos monoclonales y el *Conjugado* contiene anticuerpos policlonales, ambos específicos contra el antígeno de superficie celular. En el ensayo, una alícuota de la muestra fecal diluida es transferida a un pocillo de microensayo. El anticuerpo monoclonal inmovilizado se une al antígeno de *Giardia* si este está presente. Al agregar el *Conjugado*, este se une al complejo antígeno/anticuerpo. Cualquier material no enlazado será eliminado durante los pasos de lavado. Después de la adición del sustrato, se detecta color debido a la presencia de los complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia del antígeno de *Giardia* y del *Conjugado*.

MATERIALES PROPORCIONADOS

CONJ	ENZ	Conjugado , 7 mL (Anticuerpo policlonal de conejo contra un antígeno de superficie de <i>Giardia</i> en una solución tampón proteica que contiene un 0.02% de Timerosal)*
DIL	SPE	Diluyente , 50 mL (Solución tampón proteica que contiene un 0.02% de Timerosal)*. El <i>Diluyente</i> también puede usarse como solución de control negativo (ver PROCEDIMIENTO DE PRUEBA).
H ₂ SO ₄	0.6N	Solución de Parada , 7 mL (ácido sulfúrico 0.6 N) PRECAUCION: Evite el contacto con la piel. Si ocurre contacto lave inmediatamente con agua. Palabra de advertencia: Peligro H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
CONTROL	+	Control Positivo , 3.5 mL (Atígeno de <i>Giardia</i> en una solución tampón proteica que contiene un 0.02% de Timerosal)*
SUBS	REAG	Sustrato , 14 mL (solución que contiene tetra-metil-bencidina y peróxido de hidrógeno)
WASHBUF	20X	Tampón de Lavado Concentrado , 50 mL (Concentrado al 20X que contiene tampón fosfato salino, detergente y un 0.2% de Timerosal)* Palabra de advertencia: Advertencia H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas P260, P314, P501
MA	PLT	Placa de Microensayo , 12 tiras, cada una consiste de 8 pocillos recubiertos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra un antígeno de la superficie celular de <i>Giardia</i> (almacenados con desecante)



2 hojas adhesivas plásticas

100 pipetas graduadas desechables

*contiene mercurio



MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS

Piceta para el reactivo de lavado

Contenedor de desechos

Palillos aplicadores

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

950 mL de agua destilada para diluir el reactivo de lavado

Mezclador vórtex

Papel absorbente

Tubos de ensayo

PRECAUCIONES

- Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- No se deben mezclar los reactivos de kits distintos. No use un kit pasada la fecha de expiración designada.
- Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de ser utilizados.
- Las tapas y las puntas están codificadas por color; no las mezcle.
- Los componentes del kit deben ser inspeccionados por señales de derrame. Al arribo, el kit debe ser inspeccionado para determinar que los reactivos no estén tibios o congelados debido a condiciones de embarque inapropiadas.
- Cuando manipule los pocillos de ensayo, evite arañar el fondo de éstos porque puede dar como resultado lecturas de absorbancia elevadas.
- Sostenga los goteros en forma vertical para asegurar un correcto tamaño de gota.
- Los pocillos de microensayo sin utilizar deben ser retornados a la bolsa resellable con el desecante para protegerlos de la humedad.
- Ejecute los pasos de lavado tal como se indica para evitar altas reacciones de fondo.
- El *Sustrato* es sensible a la luz y debe ser protegido de la luz solar directa o de fuentes de luz UV.
- Al seguir el procedimiento especificado para la apueba se obtendrán óptimos

resultados. Las concentraciones, condiciones de incubación y especificaciones de procedimiento han sido optimizadas para sensibilidad y especificidad. Alteraciones del procedimiento especificado y/o de las condiciones de la prueba pueden afectar la sensibilidad y especificidad de esta.

12. Manipular las muestras y los pocillos de microanálisis utilizados como potenciales transmisores de agentes infecciosos. Utilice guantes desechables para realizar el test.
13. El *Concentrado de tampón de lavado 20X* contiene timerosal al 0,2% como conservante. Una vez diluida hasta la concentración de uso normal, esta solución se clasifica como no peligrosa. La Solución de Parada contiene ácido sulfúrico 0,6 N. Aclarar inmediatamente con agua si se produce el contacto. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Manejar los reactivos de acuerdo con las normas existentes de seguridad de laboratorio y buenas prácticas de laboratorio. Se dispone de fichas de datos de seguridad de este producto bajo pedido, consultar al soporte técnico.
14. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos. No lo tire a la basura, elimínelo como residuo peligroso.

VIDA ÚTIL Y ALMACENAJE

La fecha de expiración del kit está indicada en la etiqueta. Las fechas de expiración para cada componente están listadas en etiquetas individuales. El kit debe ser almacenado entre 2° y 8°C y tras su uso, deberá ser regresado al refrigerador tan pronto sea posible.

MANEJO DE LA MUESTRA

1. Son apropiados los procedimientos estándares de laboratorio para recolección y manejo de especímenes fecales para cultivo. No es necesario modificar los métodos de recolección utilizados para exámenes microscópicos estándares de O&P. Los especímenes fecales pueden ser utilizadas sin preservantes, congeladas, o en un medio de conservación de formol tamponado al 10% o acetato sódico-formol (SAF).
2. Las muestras sin preservantes deben ser almacenados entre 2° y 8°C y analizadas en menos de 24 horas desde su recolección. Las muestras que no puedan ser examinadas en este tiempo, deberán guardarse a -20°C o menos hasta ser examinadas.
3. Las muestras con preservantes pueden mantenerse a temperatura ambiente y ser examinadas dentro de los siguientes 18 meses después de su recolección.
4. No es necesario realizar pasos de concentración para especímenes fecales.
5. Asegúrese que las muestras estén completamente mezcladas (vórtex) antes de realizar el ensayo. Esto incluye un mezclado completo del espécimen antes de transferirlo al *Diluyente* y/o los pocillos de microensayo.
6. Todas las diluciones deben ser realizadas con le *Diluyente*.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Los contenidos del kit deben ser llevados a temperatura ambiente antes de usarse.
2. Prepare la *Solución de Lavado 1X*. El *Tampón de Lavado Concentrado* ha sido proporcionado como un concentrado al 20X (se puede observar un precipitado). Debe ser diluido hasta aforar a un volumen de 1 litro mediante la adición de 50 mL del concentrado a 950 mL de agua destilada. La *Solución de Lavado 1X* puede almacenarse entre 2° y 8°C.

PREPARACION DE LA MUESTRA

1. Fecas Frescas/Congeladas: La muestras fecales congeladas deben ser descongeladas. Agregue 400 µL del *Diluyente* a un tubo de microcentrífuga (uno por muestra), luego agregue 100 µL (2° marca de graduación en la pipeta) de la muestra al tubo y mezcle bien. Esta es una dilución 1:5. Si la muestra no puede ser pipeteada, use un palillo aplicador para transferir aproximadamente 0.1 gramos de fecas. Esto tiene aproximadamente el tamaño de un guisante pequeño (alrededor de 4 mm de diámetro). Realice la dilución final en los pocillos de microensayo tal como se indica en el PROCEDIMIENTO.

2. Muestras Fecales Conservadas: Mezcle (vórtex) los contenidos del envase antes del transferir la muestra. No se requiere de procesamiento o dilución adicional. Realice la dilución final en los pocillos de microensayo tal como se indica en el PROCEDIMIENTO.

PROCEDIMIENTO

1. Se deben utilizar dos pocillos de control cada vez que se ejecute la prueba. Estos pocillos serán los controles positivos y negativos. Se requiere de un pocillo para cada muestra. Sostenga los goteros verticalmente cuando agregue las gotas. Se pueden escribir marcas de identificación directamente por los costados de los pocillos. Agruegue 1 gota (50 μL) del *Control Positivo* (tapa negra) al pocillo del control positivo y 2 gotas (100 μL , 2° marca de graduación en la pipeta de transferencia) del control negativo (*Diluyente*) al pocillo del control negativo.
2. Si se utilizan muestras frescas o congeladas (es decir, sin preservantes), haga una dilución 1:5 de la muestra tal como se induca en la sección PREPARACION DE LA MUESTRA.
3. Transfiera 100 μL del *Diluyente* a cada pocillo de muestra en la *Placa de Microensayo*. Usando las pipetas plásticas, transfiera 1 gota (50 μL , (1° marca de graduación en la pipeta) de la muestra (conservada o diluida como se indicó anteriormente) a cada pocillo de muestra que ya contiene el *Diluyente* y golpee suavemente para mezclar. Selle con un sellador de placas e incube 1 hora a temperatura ambiente.
4. Elimine los contenidos de la placa dentro de un contenedor de desechos. Lave cada pocillo utilizando la *Solución de Lavado 1X* en una pipeta con punta fina, dirigiendo con fuerza la *Solución de Lavado* al fondo de los pocillos. Llene los pocillos, elimine los contenidos dentro de un contenedor de desechos y golpee con fuerza la placa invertida sobre toallas de papel secas. Repita los pasos de lavado 3 veces (para un total de 4 lavados). Si aún persiste material fecal dentro de los pocillos, continúe los lavados hasta que la placa se vea limpia.
5. Después de lavar, elimine completamente cualquier líquido residual golpeando la placa invertida sobre toallas de papel secas hasta que no salga más líquido. Deseche las toallas de papel y los envases de muestras en forma adecuada.
6. Agregue 1 gota (50 μL) del *Conjugado* (tapa roja) a cada pocillo y golpee suavemente para mezclar. Sellar con la hoja adhesiva de plástico. Incube los pocillos por 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Repita el procedimiento de lavado (Pasos 4 y 5).
8. Agregue 2 gotas (100 μL) del *Sustrato* (tapa azul) a cada pocillo. Golpee suavemente los pocillos para mezclar incube a temperatura ambiente por 10 minutos.
9. Agregue 1 gota (50 μL) de la *Solución de Parada* a cada pocillo. Golpee suavemente los pocillos y espere 2 minutos antes de leer. La adición de la *Solución de Parada* transforma el color azul en amarillo, el cual puede ser cuantificado midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA. En el instrumento se debe ajustar el blanco con aire. Limpie la parte de abajo de los pocillos antes de medir la absorbancia. Si se utiliza un lector dual, ajuste el blanco con aire a 620 nm y lea a 450 nm. Se deben registrar las lecturas visuales. Lea dentro de los 10 minutos siguientes a la adición de la *Solución de Parada*.

CONTROL DE CALIDAD

1. Se debe correr un control positivo y uno negativo cada vez que se ejecute la prueba.
2. Cada pocillo de control positivo debe tener un color amarillo fácilmente visible y debe dar una absorbancia de 0.500 o mayor. Cualquier pocillo que de una lectura positiva sin color visible debe ser reubicado, se le debe limpiar la parte de abajo y debe ser leído nuevamente.
3. Los pocillos de control negativo deben ser incoloros o pueden tener un leve color amarillo pero deben tener una absorbancia <0.150 cuando se lee con una longitud de onda única ($\text{OD}_{450\text{ nm}}$) o <0.090 cuando se lee con longitud de onda dual ($\text{OD}_{450/620\text{ nm}}$).

4. Los resultados de la prueba no serán válidos a menos que se cumpla con los requisitos de rendimiento de los controles positivo y negativo. Si no se obtienen estos resultados, llame al Servicio técnico.
5. Los resultados de las pruebas, junto con los valores de absorbancia de los controles deben ser registrados y reportados de acuerdo a los procedimientos internos y deben ser almacenados de acuerdo a los procedimientos internos para futuras referencias.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Absorbancia		Color Visual	Interpretación
450 nm	450/620 nm		
<0.150	<0.090	Transparente o ligero color amarillo	Negativo -Bajo los límites de detección del ensayo
≥0.150	≥0.090	Amarillo suave a intenso	Positivo - la muestra contiene antígenos de <i>Giardia</i>

Interpretación Visual

Negativa: Cualquier muestra que sea descolorida o se asemeja evidentemente más amarilla que el pocillo del control negativo

Positiva: Cualquier muestra que sea evidentemente más amarilla que el pocillo del control negativo.

NOTA: El control negativo, al igual que algunos de los pocillos de prueba, pueden mostrar un ligero color amarillo. Una muestra debe ser evidentemente más oscura que el pocillo del control negativo para poder considerarla como un resultado positivo.

Interpretación Espectrofotométrica

1. Determine el valor de absorbancia para el control negativo. La lectura del control negativo deberá ser <0.150. Si no lo es, la prueba no es válida y deberá ser repetida, prestando atención al procedimiento de lavado.
2. La lectura del *Control Positivo* debe ser de 0.500 o mayor.
3. Resultados de las pruebas
Negativo: <0.150(absorbancia a 450 nm) o <0.090 (absorbancia a 450/620 nm)
Positivo: ≥0.150 (absorbancia a 450 nm) o ≥0.090 (absorbancia a 450/620 nm)

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. La prueba *GIARDIA II™* detecta la presencia del antígeno de *Giardia* en especímenes fecales. Este antígeno está presente principalmente en la forma quística del parásito.
2. Los resultados de la prueba deben ser interpretados por un médico teniendo en consideración otros resultados de laboratorio y la historia clínica.
3. Especímenes fecales concentradas no deberan ser sometidas a la prueba *GIARDIA II™* ya que no se obtendrán resultados exactos.
4. El valor predictivo de un resultado positivo se reduce cuando se prueba en una población de baja prevalencia.
5. La prueba *GIARDIA II™* es para la detección cualitativa del antígeno de *Giardia* en especímenes fecales. No ha sido evaluada para la detección cuantitativa de la carga del microorganismo, y la magnitud de los valores de absorbancia no se correlacionan con la carga.

VALORES ESPERADOS

Individuos normales sanos no deberían estar infectados con *Giardia* y deberían ser negativos a la prueba *GIARDIA II™*. Un resultados positivo el la prueba *GIARDIA II™* indica que la persona esta eliminando cantidades detectables de antígenos de *Giardia*. La incidencia de la infección por *Giardia* varía significativamente entre distintas poblaciones y ubicaciones geográficas. Niños en jardines infantiles han mostrado mayores tasas de infección por *Giardia* que la población normal (21). Además, los hombres homosexuales tienen mayores tasas de infección (22).

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

En un estudio realizado en TECHLAB, Inc, la prueba *GIARDIA II*TM fue evaluada utilizando muestras fecales frescas y muestras fecales conservadas en Formalina al 10%, o SAF. Las muestras utilizadas en este estudio fueron identificadas como positivas a *Giardia* mediante microscopía en laboratorios externos. Las muestras positivas provinieron de pacientes con edades entre tres y ochenta y nueve. De 203 muestras analizadas, 110 fueron determinadas positivas por microscopía. La prueba *GIARDIA II*TM detectó las 110 muestras positivas. Un total de 93 muestras negativas a *Giardia* fueron analizadas. Todas las 93 muestras negativas a *Giardia* fueron negativas en la prueba *GIARDIA II*TM. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de la prueba *GIARDIA II*TM con microscopía (n = 203).

		Microscopía	
		+	-
<i>GIARDIA II</i> TM	+	110	0
	-	0	93

Sensibilidad	100%
Especificidad	100%
Valor Predictivo Positivo	100%
Valor Predictivo Negativo	100%
Correlación	100%

En un estudio interno adicional, la prueba *GIARDIA II*TM fue comparada con otro ELISA disponible comercialmente, utilizando muestras fecales frescas y muestras fecales conservadas en Formalina al 10% o SAF. Las muestras utilizadas en este estudio fueron determinadas *Giardia* positivas por microscopía en laboratorios externos. De las 128 muestras analizadas, 88 fueron encontradas positivas en microscopía. La prueba *GIARDIA II*TM detectó todas las 88 muestras positivas mientras que el otro ELISA comercial detectó 86 de las 88 muestras positivas. Un total de 40 muestras negativas fueron analizadas. Todas las 40 muestras negativas fueron negativas tanto en la prueba *GIARDIA II*TM como en el otro ELISA comercial. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación entre el otro ELISA comercial y la prueba *GIARDIA II*TM con microscopía (n = 128).

		Microscopía	
		+	-
Otro ELISA Comercial	+	86	0
	-	2	40

		Microscopía	
		+	-
<i>GIARDIA II</i> TM	+	88	0
	-	0	40

	Otro ELISA Comercial	<i>GIARDIA II</i> ™
Sensibilidad	97,7%	100%
Especificidad	100%	100%
Valor Predictivo Positivo	100%	100%
Valor Predictivo Negativo	95,2%	100%
Correlación	98,4%	100%

REACCIONES CRUZADAS

La prueba *GIARDIA II*™ fue evaluada usando especímenes fecales positivas para una variedad de parásitos intestinales. No se observó reacción cruzada con especímenes fecales que contenían cualquiera de los parásitos fecales listados abajo. El número de especímenes probó con cada organismo es mostrado en el paréntesis.

<i>Ascaris lumbricoides</i> (2)	<i>Blastocystis hominis</i> (8)	<i>Chilomastix mesnili</i> (2)
<i>Clonorchis</i> (1)	<i>Cryptosporidium parvum</i> (8)	<i>Dientamoeba fragilis</i> (3)
<i>Endolimax nana</i> (3)	<i>Entamoeba coli</i> (4)	<i>Entamoeba hartmanni</i> (2)
<i>Entamoeba histolytica</i> (2)	Hookworm (2)	<i>Iodamoeba butchlii</i> (2)
<i>Isospora belli</i> (2)	Rotavirus (11)	<i>Schistosoma mansoni</i> (2)
<i>Strongyloides stercoralis</i> (3)	<i>Trichuris trichiura</i> (2)	

PRECISION INTER-ENSAYO

Para determinar el rendimiento inter-ensayo, se analizaron con el kit *GIARDIA II*™ cuatro muestras fecales positivas y cuatro negativas, un total de cinco veces sobre un periodo de cinco días. El % del Coeficiente de Variación (CV) de las muestras positivas tuvo un rango entre 3,5 a 8,0 con un promedio de 5,2. El % del Coeficiente de Variación (CV) de las muestras negativas tuvo un rango entre 3,4 a 14,9, con un promedio de 8,3.

PRECISION INTRA-ENSAYO

El % del Coeficiente de Variación (CV) fue determinado mediante el análisis de cuatro muestras fecales positivas y cuatro muestras fecales negativas. Cada muestra fue analizada en doce posillos de prueba. El % del Coeficiente de Variación (CV) de las muestras positivas tuvo un rango de 2,9 a 11,4, con un promedio de 7,1. El % del Coeficiente de Variación (CV) de las muestras negativas tuvo un rango entre 7,9 y 36,9, con un promedio de 22,8.

ANWENDUNGSZWECK

Der *GIARDIA II™* test ist ein Enzym-Immun-Test zum qualitativen Nachweis von Antigenen der *Giardia lamblia* Zysten in menschlichen Stuhlproben. Dieser Test ist dazu angelegt, Stuhlproben von Patienten mit Durchfallerkrankungen zu untersuchen, um eine *Giardia lamblia* Infektion des Magen-Darm-Trakts nachzuweisen. Der Test kann bei routinemäßigen klinischen Untersuchungen von Stuhlproben von Erwachsenen und Kindern angewendet werden.

ERLÄUTERUNG

Giardia ist ein binuklearer, geißelförmiger einzelliger Parasit, der in zwei Formen existiert: ein nicht-infektiöser birnenförmiger im Dünndarm angesiedelter Trophozoit (9 bis 20 µm) und die höchst-infektiöse Zystenform, die elliptisch geformt ist und in der Größe von 8 bis 12 µm variiert (1). Außerhalb des Gastkörpers überleben die beiden Formen in unterschiedlicher Weise: der Trophozoit ist extrem labil und überlebt nur einige Stunden außerhalb des Gastkörpers, während die Zystenform mehrere Tage in einer externen Umgebung überleben kann (1). Der Parasit verursacht Infektionen aufgrund von Wasserverunreinigungen, und Reisende haben sich Giardiasis in befallenen Gegenden zugezogen (2-5). Die Übertragung erfolgt auch durch direkten Kontakt, insbesondere mit asymptomatischen Trägern und durch verdorbene Lebensmittel (6,7). Personengruppen mit hohem Risiko sind Kleinkinder, Patienten mit schwachen Immunsystemen und Patienten, die noch nie damit in Berührung gekommen sind (8). In letzter Zeit, hat sich Giardiasis zu einer allgemeinen sexuell übertragbaren Krankheit entwickelt (9).

Giardia wurde in allen tierischen Gastkörpern gefunden und Verunreinigung von Wasser mit tierischen Fäkalien ist eine weitere Art der Übertragung an Menschen (4,10,11). Klinische Fälle von Giardiasis reichen von asymptomatischen Befall mit Ausscheidung der Zysten bis hin zu entkräftenden chronischen Durchfallerkrankungen, Gewichtsverlust und Malabsorption (8,12,13). Die mikroskopische Diagnose ist die häufigste Diagnosemethode für Giardiasis. Allerdings erfordert dieses Verfahren lange Erfahrung und intakte Zysten müssen im Stuhl vorhanden sein. Ein alternativer Test ist der ELISA. Dieses Verfahren ist einfach zu handhaben und es zeigt eine größere Sensitivität als das mikroskopische Verfahren. Stuhlproben werden mit verschiedenen Techniken untersucht (14) und die Genauigkeit der Ergebnisse hängt stark von den individuellen Fähigkeiten des Testers ab. Die Erfolgsrate der Stuhlproben-Untersuchungen variiert zwischen 50 und 70% (15,16) und normalerweise sind mehrere Stuhlproben notwendig, um eine Diagnose zu stellen. Giardiasis kann auch vorliegen, wenn nicht der gesamte Organismus im Stuhl vorhanden ist, und kann auch mit anderen Krankheiten wie Crohn's Erkrankung und geschwürbildender Kolitis verwechselt werden (17). Wenn eine Infektion vorliegt, aber keine Parasiten gefunden werden, kann das Testen einer Probe von Flüssigkeit aus dem Zwölffingerdarm die Trophozoiten evtl. nachweisen, aber diese Methode stellt einen medizinischen Eingriff dar und ist teuer (14,16). Ein Nachweis des Organismus und des Antigens mit ELISA stellt eine alternative Diagnosemethode dar und ist sensitiv und spezifisch (18-20). Eine große Anzahl von Stuhlproben kann schnell und objektiv getestet werden, und das Verfahren ist weniger arbeitsintensiv als einige der mikroskopischen Methoden.

BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN

Der *GIARDIA II™* test benutzt monoklonale und polyklonale Antikörper eines Antigens der Zelloberfläche des Organismus. Die *Mikroanalyse-Platte* des Analyse-Sets enthält immobilisierte monoklonale Antikörper und das *Konjugat* besteht aus polyklonalen Antikörpern, von denen beide spezifisch auf das Antigen der Zelloberfläche reagieren. In der Analyse wird eine Aliquote einer verdünnten Stuhlprobe in die Mikroanalyse-Schalen übertragen. Der immobilisierte monoklonale Antikörper bindet an das *Giardia* Antigen falls das Antigen vorhanden ist. Bei der Zugabe bindet das Konjugat an den Antigen/Antikörper Komplex. Alle ungebundenen Materialien werden in den Waschvorgängen entfernt. Nach Zugabe des Substrats erfolgt eine Farbveränderung, da ein Enzym-Antikörper-Antigen Komplex gebildet wird, wenn das *Giardia* Antigen und *Konjugat* vorliegen.

PACKUNGSINHALT

CONJ | ENZ

Konjugat, 7 mL (Kaninchen polyklonaler Antikörper, der auf das Antigen der Zelloberfläche von *Giardia* reagiert in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal)*

DIL | SPE

Verdünnungspuffer, 50 mL (gepufferte Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal)*. Der **Verdünnungspuffer** wird auch als Negativ-Kontrolllösung benutzt (siehe TESTVERFAHREN).

H₂SO₄ | 0.6N

Stopplösung, 7 mL (0,6 N Schwefelsäure). Achtung: Hautkontakt vermeiden. Sofort mit Wasser spülen, wenn sie in Berührung mit der Haut gerät. Signalwort: Gefahr

H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.



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

CONTROL | +

Positive Kontrolle, 3,5 mL (*Giardia* Antigen in einer gepufferten Proteinlösung, die 0,02% Thimerosal enthält)*

SUBS | REAG

Substrat, 14 mL (Lösung mit Tetramethylbenzidin und Peroxyd)

WASHBUF | 20X

Waschpuffer-konzentrat, 50 mL (20X Konzentrat, das Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Reinigungsmittel und 0,2% Thimerosal enthält)*

Signalwort: Warnung

H373: Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition P260, P314, P501



MA | PLT

Mikroanalyse-Platte, 12 Streifen, von denen jeder 8 Schalen enthält, die mit monoklonalem Antikörper zum *Giardia* Zelloberflächen Antigen beschichtet sind (mit Trockenmittel gelagert)

2 Klebefolien aus Plastik**100 geeichte Einweg-Pipetten**

*enthält Quecksilber

**NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN DIE BENÖTIGT WERDEN**

Spritzflasche für Waschreagenz

950 mL destilliertes Wasser zum Verdünnen des Waschreagenz

ELISA Lesegerät mit Lesekapazität bei 450 nm oder 450/620 nm

Mikrozentrifuge-Reagenzgläser

Vortex Schüttler

Abfallbehälter

Saugfähiges Papier

Holzstäbchen

VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Nur für die *In-Vitro*-Diagnostik.
2. Reagenzien von verschiedenen Sets sollten nicht gemischt werden. Benutzen Sie das Analyse-Set nicht nach dem Verfallsdatum.
3. Reagenzien sollten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.
4. Verschlüsse und Fläschchen sind farbkodiert; nicht verwechseln.
5. Jede Komponente des Sets sollte auf Schadstellen untersucht werden. Bei Lieferung sollte das Analyse-Set inspiziert werden, damit sichergestellt wird, dass keine der Komponenten aufgrund von unsachgemäßen Transportbedingungen gefroren ist oder sich warm anfühlt.
6. Vermeiden Sie den Boden der Analyse-Schalen zu zerkratzen, sonst können erhöhte Absorptionswerte daraus resultieren.
7. Halten Sie die Tropfflaschen senkrecht damit die korrekte Tropfengröße sichergestellt wird.
8. Unbenutzte Mikroanalyse-Schalen müssen zusammen mit dem Trockenmittel wieder in den wiederverschließbaren Beutel zurückgelegt werden, um sie vor Feuchtigkeit zu schützen.
9. Waschen Sie wie vorgeschrieben um hohe Hintergrundreaktionen zu vermeiden.
10. Das **Substrat** ist lichtempfindlich und sollte vor direktem Sonnenlicht oder UV-Quellen geschützt werden.

11. Optimale Ergebnisse werden erzielt, wenn das vorgegebene Testverfahren eingehalten wird. Die Konzentrationen, Inkubationsbedingungen und Verfahrensvorgaben wurden hinsichtlich Sensitivität und Spezifität optimiert. Abweichungen von dem vorgegebenen Verfahren und/oder Testbedingungen können die Sensitivität und Spezifität des Tests beeinflussen.
12. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Kavitäten als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Einweghandschuhe.
13. Das 20-fache *Waschpufferkonzentrat* enthält 0,2 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Sobald sie auf normale Gebrauchskonzentration verdünnt ist, wird diese Lösung als ungefährlich eingestuft. Die *Stopplösung* enthält 0,6 N Schwefelsäure. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Reagenzien gemäß vorhandenen Vorschriften für die Laborsicherheit und gute Laborpraxis behandeln. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Nachfrage erhältlich. Wenden Sie sich an den technischen Support.
14. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung. Nicht zum Hausmüll geben, als gefährlichen Abfall entsorgen.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum des Analyse-Sets ist auf dem Etikett angegeben. Verfallsdaten für jede der Komponenten sind auf den einzelnen Komponentenetiketten angegeben. Das Analyse-Set sollte bei Temperaturen zwischen 2° und 8°C gelagert werden und sofort nach Gebrauch wieder im Kühlschrank aufbewahrt werden.

BEHANDLUNG DER STUHLPROBEN

1. Die üblichen Methoden für Abnahme und Behandlung der Stuhlproben sind akzeptabel. Eine Abwandlung der für normale mikroskopische O&P (Ova und Parasiten) Untersuchungen angewandten Methoden ist nicht erforderlich. Stuhlproben können unkonserviert oder gefroren, oder in einem Konservierungsmittel mit 10% gepuffertem Formalin oder Natriumacetat-Formalin Fixativ (NAF), verwendet werden.
2. Unkonservierte Proben sollten bei Temperaturen zwischen 2° und 8°C gelagert und innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme getestet werden. Proben die nicht innerhalb dieser Zeitspanne getestet werden können, sollten bei -20°C oder tieferen Temperaturen bis zum Test gelagert werden.
3. Konservierte Proben können bei Raumtemperatur gelagert werden und sollten innerhalb von 18 Monaten nach der Entnahme getestet werden.
4. Konzentrationsschritte sind nicht notwendig (oder empfohlen) für Stuhlproben.
5. Achten Sie darauf, dass die Proben gut durchgerührt sind (im Vortex), bevor Sie den Test durchführen. Insbesondere müssen sie vor der Übertragung in den *Verdünnungspuffer* und/oder die Mikrotiterplatte vollständig gemischt werden.
6. Alle Verdünnungen müssen mit dem *Verdünnungspuffer* vorgenommen werden.

REAGENZ VORBEREITUNG

1. Vor dem Gebrauch sollte der Inhalt des Analyse-Sets auf Raumtemperatur gebracht werden.
2. Bereiten Sie 1X *Reinigungsflüssigkeit* zu. Das *Waschpuffer-konzentrat* wird als 20X Konzentrat geliefert (Ausfall kann eventuell sichtbar sein). Es sollte auf ein Volumen von 1 Liter verdünnt werden, indem 50 mL des Konzentrats mit 950 mL destilliertem Wasser vermischt werden. Die 1X *Reinigungsflüssigkeit* kann bei Temperaturen zwischen 2° und 8° C gelagert werden.

VORBEREITUNG DER STUHLPROBEN

1. Frische/Gefrorene Stuhlproben: Gefrorene Stuhlproben sollten aufgetaut werden. Geben Sie 400 µL *Verdünnungspuffer* in ein Mikrozentrifugen-Reagenzglas (1x je Probe), und anschließend geben Sie 100 µL (zweite Eichmarkierung auf der Pipette) der Probe in das Reagenzglas und mischen Sie gut. Das erzeugt eine Verdünnung im Maßstab von 1:5. Wenn die Probe nicht pipettiert werden kann, benutzen Sie ein Holzstäbchen

um ungefähr 0,1 Gramm der Stuhlprobe zu übertragen. Das entspricht etwa der Größe einer kleinen Erbse (etwa 4 mm Durchmesser). Führen Sie die endgültige Verdünnung in den Mikroanalyse-Schalen durch, wie in dem VERFAHREN vorgeschrieben.

2. Konservierte Stuhlproben: Mischen Sie (mit Vortex) den Inhalt des Behälters gut durch bevor Sie die Probe übertragen. Weitere Bearbeitung oder Verdünnung ist nicht notwendig. Führen Sie die endgültige Verdünnung in den Mikroanalyse-Schalen durch, wie in dem VERFAHREN vorgeschrieben.

TESTVERFAHREN

1. Bei jedem Test müssen zwei Kontrollschalen benutzt werden. Diese Schalen dienen zur Negativ- und Positiv-Kontrolle. Je eine Schale wird für jeden Test, der durchgeführt wird, benötigt. Halten Sie die Tropfflaschen senkrecht, wenn Sie die Tropfen zugeben. Identifizierungskennzeichen können direkt auf die Seitenwände der Schale geschrieben werden. Geben Sie 1 Tropfen (50 µL) des *Positiven Kontrollmittels* (schwarzer Verschluss) in die Schale zur positiven Kontrolle und 2 Tropfen (100 µL, zweite Eichmarkierung auf der Übertragungspipette) des negativen Kontrollmittels (*d.h., Verdünnungspuffer*) in die Schale zur negativen Kontrolle.
2. Bei der Verwendung von frischen oder gefrorenen Stuhlproben (*d.h., unkonserviert*), erzeugen Sie eine 1:5 Verdünnung wie oben unter VORBEREITUNG DER PROBEN vorgeschrieben ist.
3. Übertragen Sie 100 µL *Verdünnungspuffer* in jede Testschale der *Mikroanalyse-Platte*. Benutzen Sie Plastikpipetten, und übertragen Sie 1 Tropfen (50 µL, erste Eichmarkierung auf der Pipette) der Stuhlprobe (konserviert oder verdünnt wie oben vorgeschrieben) in jede Testschale, die bereits *Verdünnungspuffer* enthält, und klopfen Sie leicht an die Schalen, um den Inhalt zu mischen. Dichten Sie mit einer Dichtplatte ab und inkubieren Sie bei Raumtemperatur für 1 Stunde.
4. Schütteln Sie den Inhalt der Analyseschalen in einen Abfallbehälter aus. Spülen Sie jede Schale mit einer feindüsigen Spritzflasche mit 1X *Reinigungsflüssigkeit* aus, indem Sie die *Reinigungsflüssigkeit* kräftig auf den Schalenboden spritzen. Füllen Sie die Schalen, und schütteln Sie dann die *Reinigungslösung* aus der Schale in einen Abfallbehälter, und klopfen Sie die Schale kräftig auf ein trockenes Papiertuch. Wiederholen Sie den Waschkvorgang 3X (insgesamt 4-Mal). Falls irgendwelche Restfäkalien noch in den Schalen verbleiben, waschen Sie die Platte bis diese sauber aussieht.
5. Nach dem Waschen entfernen Sie alle Restflüssigkeit von den Schalen, indem Sie diese gegen ein trockenes Papiertuch klopfen bis keine Flüssigkeit mehr abgegeben wird. Entsorgen Sie die Papiertücher und Probenbehälter in angemessener Weise.
6. Geben Sie 1 Tropfen (50 µL) des *Konjugats* (roter Verschluss) in jede Schale und klopfen Sie leicht an die Schalen, um den Inhalt zu mischen. Verschließen Sie alles mit einem Kunststoff-Klebbogen. Inkubieren Sie die Schalen bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
7. Wiederholen Sie den Waschkvorgang (Schritte 4 und 5).
8. Geben Sie 2 Tropfen (100 µL) des *Substrats* (blauer Verschluss) in jede Schale. Klopfen Sie leicht an die Schalen, um den Inhalt zu vermischen. Inkubieren Sie die Schalen bei Raumtemperatur für 10 Minuten.
9. Geben Sie 1 Tropfen (50 µL) der *Stopplösung* (gelber Verschluss) in jede Schale. Klopfen Sie leicht an die Schalen und warten Sie 2 Minuten vor dem Ablesen. Wenn die *Stopplösung* hinzugegeben wird, erfolgt eine Farbveränderung von blau nach gelb, die quantifiziert werden kann, wenn die Absorptionswerte bei 450 nm auf einem Mikroplatten ELISA - Lesegerät gemessen werden. Das Instrument sollte gegen Luft abgeglichen werden. Wischen Sie die Unterseite jeder Schale ab, bevor Sie die Absorptionswerte messen. Wenn ein duales Lesegerät verwendet wird, gleichen Sie den Nullwert gegen Luft bei 620 nm ab und lesen Sie bei 450 nm ab. Visuell abgelesene Werte sollten notiert werden. Lesen Sie innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der *Stopplösung* ab.

QUALITÄTSKONROLLE

1. Jede Testserie muss eine positive und eine negative Kontrolle einschließen.
2. Jede Schale zur positiven Kontrolle sollte eine deutliche Gelbfärbung aufweisen und sollte einen Absorptionswert von 0,500 oder höher haben. Schalen, die bei visueller Kontrolle farblos erscheinen, aber positive Werte liefern, sollten neu positioniert, an der Unterseite abgewischt, und neu abgelesen werden.
3. Negative Kontrollschalen sollten farblos sein oder sie können eine leichte Gelbfärbung haben, sie müssen aber einen Absorptionswert von $<0,150$ aufweisen wenn mit einer Einzel-Wellenlänge ($OD_{450\text{ nm}}$) bzw. $<0,090$ wenn mit einer Dual-Wellenlänge ($OD_{450/620}$) abgelesen wird.
4. Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kriterien für positive und negative Kontrollen erfüllt sind. Wenn das nicht der Fall ist, setzen Sie sich bitte mit dem Technischen Dienst in Verbindung.
5. Testergebnisse sollten zusammen mit den Kontroll-Absorptionswerten dokumentiert werden und nach den geltenden Laborvorschriften weitergegeben und als künftige Referenz gespeichert werden.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Absorptionswerte		Sichtbare Farbe	Interpretation
450 nm	450/620 nm		
$<0,150$	$<0,090$	Klar bis leicht Gelb	Negativ - Unterhalb der Nachweisgrenzen der Analyse
$\geq 0,150$	$\geq 0,090$	Leicht Gelb bis stark Gelb	Positiv – Die Probe enthält <i>Giardia</i> Antigen

Visuelle Interpretation

Negativ: Jede Probe, die farblos ist oder der Negativ-Kontrollschale in der Farbintensität ähnelt.

Positiv: Jede Probe, die offensichtlich stärker gelb gefärbt ist als die Schale Negativ-Kontrolle.

ANMERKUNG: Die Negativ-Kontrolle und auch einige der Schalen mit Proben, können eine leichte Gelb-Färbung zeigen. Eine Probenschale muss deutlich dunkler sein als die Negativ-Kontrollschale, um als positives Testergebnis zu gelten.

Spektrophotometrische Interpretation.

1. Bestimmen Sie den Absorptionswert für die Negativ-Kontrolle. Der Negativ-Kontrollwert sollte $<0,150$ OD_{450} oder $<0,090$ $OD_{450/620}$ betragen. Sonst ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden, indem besonders auf den Waschvorgang geachtet wird.
2. Der abgelesene Wert für die Positiv-Kontrolle sollte $\geq 0,500$ sein.
3. Testergebnisse
 Negativ: $<0,150$ (Absorptionswert gemessen bei 450 nm) oder $<0,090$ (Absorptionswert gemessen bei 450/620 nm)
 Positiv: $\geq 0,150$ (Absorptionswert gemessen bei 450 nm) oder $\geq 0,090$ (Absorptionswert gemessen bei 450/620 nm)

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Der *GIARDIA* II™ Test weist das *Giardia* Antigen in Stuhlproben nach. Dieses Antigen ist hauptsächlich in der Zystenform des Parasiten vorhanden.
2. Die Testergebnisse sollten von einem Arzt interpretiert werden, auch im Hinblick auf andere Testergebnisse und unter Berücksichtigung der Krankengeschichte des Patienten.
3. Konzentrierte Stuhlproben sollten nicht mit dem *GIARDIA* II™ Test analysiert werden, denn diese Stuhlproben würden keine genauen Ergebnisse liefern.
4. Die Aussagekraft eines positiven Tests verringert sich, wenn in einer Testgruppe/Bevölkerung mit geringem Befall getestet wird.

5. Der *GIARDIA II*TM Test ist konzipiert für den qualitativen Nachweis von *Giardia* Antigen im Stuhl. Das Verfahren ist nicht dafür bestimmt, eine quantitative Bestimmung der Anzahl vorhandener Organismen vorzunehmen, und die Größe der Absorptionswerte ist nicht korreliert mit der Anzahl der Organismen.

ERWARTUNGSWERTE

Normal gesunde Personen sollten nicht mit *Giardia* infiziert sein und sollten ein negatives Ergebnis im *GIARDIA II*TM zeigen. Ein positives Testergebnis im *GIARDIA II*TM Test zeigt, dass die betreffende Person nachweisbare Mengen des *Giardia* Antigens abgibt. Das Vorkommen von *Giardia* Infektionen variiert deutlich nach Bevölkerung und geographischer Region. Kinder in Tagesbetreuungsstätten zeigen höhere Infektionsraten mit *Giardia* als die normale Bevölkerung (21). Auch sind homosexuelle Männer häufiger infiziert (22).

LEISTUNGSMERKMALE

In einer Studie, die bei TECHLAB, Inc. durchgeführt wurde, wurde der *GIARDIA II*TM Test bewertet, unter Verwendung von frischen Stuhlproben und Stuhlproben, die in 10% Formalin oder NAF (Natriumacetat-Formalin) konserviert waren. Die Studie schließt Proben ein, die mit der Mikroskopiemethode in externen Laboratorien als *Giardia*-positiv identifiziert wurden. Die positiven Proben kamen von Patienten im Alter von 3 bis 89. Von den 203 analysierten Proben wurden 110 mit der Mikroskopiemethode positiv befunden. Der *GIARDIA II*TM Test wies alle 110 der positiven Proben nach. Insgesamt wurden 93 *Giardia*-negativ Proben getestet. Alle 93 der *Giardia*-negativen Proben testeten negativ mit dem *GIARDIA II*TM Test. Tabelle 1 zeigt diese Ergebnisse.

Tabelle 1. Ein Vergleich des *GIARDIA II*TM Tests mit der Mikroskopiemethode (n = 203).

		Mikroskopie	
		+	-
<i>GIARDIA II</i> TM	+	110	0
	-	0	93

Sensitivität	100%
Spezifität	100%
Vorausgesagter Positiver Wert	100%
Vorausgesagter Negativer Wert	100%
Korrelation	100%

In einer zusätzlichen internen Studie, wurde das *GIARDIA II*TM Set mit einem anderen handelsüblichen ELISA-Test verglichen, unter Verwendung von frischen Stuhlproben und Stuhlproben, die in 10% Formalin oder NAF (Natriumacetat-Formalin) konserviert waren. Die Studie schließt Proben ein, die mit der Mikroskopiemethode von externen Laboratorien als *Giardia*-positiv identifiziert wurden. Von den 128 analysierten Proben wurden 88 mit der Mikroskopiemethode positiv befunden. Der *GIARDIA II*TM Test wies alle 88 der positiven Proben nach, wobei der andere handelsübliche ELISA-Test 86 der 88 positiven Proben nachwies. Insgesamt wurden 40 negative Proben getestet. Alle 40 der *Giardia*-negativen Proben testeten negativ sowohl in dem *GIARDIA II*TM als auch in dem anderen handelsüblichen ELISA-Test. Tabelle 2 zeigt diese Ergebnisse.

Tabelle 2. Ein Vergleich eines anderen handelsüblichen ELISA-Test und des *GIARDIA II*TM Tests mit der Mikroskopiemethode (n = 128).

		Mikroskopie	
		+	-
Anderer Handelsüblicher ELISA	+	86	0
	-	2	40

		Mikroskopie	
		+	-
<i>GIARDIA II</i> TM	+	88	0
	-	0	40

	Anderer Handelsüblicher ELISA	<i>GIARDIA II</i> TM
Sensitivität	97,7%	100%
Spezifität	100%	100%
Vorausgesagter Positiver Wert	100%	100%
Vorausgesagter Negativer Wert	95,2%	100%
Korrelation	98,4%	100%

KREUZ-REAKTIONEN

Der *GIARDIA II*TM Test wurde bewertet, indem Stuhlproben benutzt wurden, die für eine Reihe von Darm-Pathogenen positiv getestet wurden. Es wurden keinerlei Kreuz-Reaktionen mit den unten aufgeführten Pathogenen festgestellt. Die mit jedem der Organismen getestete Probenanzahl ist in Klammern angegeben.

<i>Ascaris lumbricoides</i> (2)	<i>Blastocystis hominis</i> (8)	<i>Chilomastix mesnili</i> (2)
<i>Clonorchis</i> (1)	<i>Cryptosporidium parvum</i> (8)	<i>Dientamoeba fragilis</i> (3)
<i>Endolimax nana</i> (3)	<i>Entamoeba coli</i> (4)	<i>Entamoeba hartmanii</i> (2)
<i>Entamoeba histolytica</i> (2)	<i>Hookworm</i> (2)	<i>Iodamoeba butchlii</i> (2)
<i>Isospora belli</i> (2)	<i>Rotavirus</i> (11)	<i>Schistosoma mansoni</i> (2)
<i>Strongyloides stercoralis</i> (3)	<i>Trichuris trichiura</i> (2)	

GENAUIGKEIT - INTER-ANALYSE

Für die Bestimmung der Inter-Analyse Leistung, wurden vier positive und vier negative Stuhlproben fünfmal in einem Zeitraum von fünf Tagen mit dem *GIARDIA II*TM Set analysiert. Der % - Variationskoeffizient (CV) von positiven Proben rangierte von 3,5 bis 8,0, mit einem Durchschnittswert von 5,2. Der % - Variationskoeffizient (CV) von negativen Proben rangierte von 3,4 bis 14,9, mit einem Durchschnittswert von 8,3.

GENAUIGKEIT - INTRA-ANALYSE

Der Intra-Analyse % Variationskoeffizient (CV) wurde bestimmt, indem vier positive und vier negative Stuhlproben analysiert wurden. Jede Probe wurde in 12 Testschalen analysiert. Der % - Variationskoeffizient (CV) von positiven Proben rangierte von 2,9 bis 11,4, mit einem Durchschnittswert von 7,1. Der % - Variationskoeffizient (CV) von negativen Proben rangierte von 7,9 bis 36,9, mit einem Durchschnittswert von 22,8.

UTILISATION PRÉVUE

Le test de *GIARDIA II™* est une analyse immuno-enzymatique pour la détection qualitative de l'antigène du kyste de *Giardia lamblia* dans les spécimens fécaux humains. L'utilisation est indiquée pour des spécimens fécaux provenant des patients avec diarrhée et pour déterminer la présence d'une infection gastro-intestinale par *G. lamblia*. Cette analyse peut être utilisée pour des spécimens fécaux soumis à des tests cliniques de routines, provenant d'adultes et d'enfants.

EXPLICATION

Giardia est un parasite protozoaire flagellé binucléaire qui existe sous deux formes: un trophozoïte à forme de poire non-infectieux (9 à 20 µm) qui habite le petit intestin, et la forme kyste hautement infectieuse qui est elliptique et dont les dimensions varient entre 8 et 12 µm (1). La survie dans le milieu extérieur varie de façon importante entre les deux formes: le trophozoïte qui est extrêmement labile, ne dure que quelques heures en dehors du corps, alors que la forme kyste peut survivre pour plusieurs jours dans un environnement externe (1). Le parasite est responsable pour des infections causées par l'eau contaminées et des régions endémiques sont impliqués dans la contraction par des voyageurs de la giardiose (2-5). La transmission se produit aussi par contact direct surtout par des porteurs asymptomatiques et par contamination de la nourriture (6,7). Les catégories à hauts-risques incluent les enfants, les patients immuno-compromis et ceux qui ont été exposés au préalables (8). Plus récemment, la giardiose est devenue commune parmi les maladies sexuellement transmises (9).

Giardia a été trouvé parmi tous les spécimens animaux étudiés et la contamination par la matière fécale d'origine animal, surtout par le biais de l'eau, représente une route additionnelle pour la transmission aux humains (4,10,11). Les manifestations cliniques de la giardiose s'étendent du porteur asymptomatique avec transmission du kyste, aux diarrhées chroniques débilantes, pertes de poids et malabsorption (8,12,13). Le diagnostic par microscopie représente la méthode la plus utilisée pour la giardiose. Cependant, cette procédure demande beaucoup d'expérience et la présence de kystes intacts dans les selles. Une méthode alternative est l'ELISA. Cette procédure est relativement simple à entreprendre et démontre une sensibilité supérieure comparée à l'analyse par microscopie. Les spécimens fécaux sont examinés par des techniques variées (14) et dépendent de l'habileté du microscopiste. Les taux de succès des examens des selles se trouvent entre 50 et 70% (15,16) et plusieurs spécimens sont généralement nécessaires pour établir un diagnostic. La giardiose peut aussi être présente malgré l'absence de l'organisme entier et peut donc être confondue avec la maladie de Crohn's et avec des coliques ulcéreuses (17). Quand l'infection est présente mais les parasites ne sont pas détectés, l'échantillonnage et l'analyse des fluides duodénaux détectent les trophozoïtes, toutefois cette méthode est intrusive et coûteuse (14,16). Détection de l'organisme et de l'antigène par ELISA permet une méthode alternative pour établir un diagnostic et s'est avérée sensible et spécifique (18-20). Des nombres importants de spécimens peuvent être analysés rapidement et objectivement, et la procédure est moins intensive en main-d'œuvre que certaines méthodes de microscopies.

PRINCIPES BIOLOGIQUES

Le test de *GIARDIA II™* utilise des anticorps monoclonaux et polyclonaux contre les antigènes sur la surface cellulaires de l'organisme. Les puits de micro-titres dans le kit contiennent un anticorps monoclonal immobilisé et le *Conjugué* consistant d'un anticorps polyclonal qui, tous deux, sont spécifiques contre l'antigène sur la surface cellulaires. Dans l'analyse, une portion d'un spécimen fécal dilué est transféré à un puits de micro-titre. Si l'antigène de *Giardia* est présent, il s'attache à l'anticorps monoclonal immobilisé. Suivant son addition, le *Conjugué* s'attache au complexe antigène/anticorps. Le matériel non-lié est éliminé durant les étapes de nettoyage. Suivant l'addition du substrat, une couleur

est détectée causée par la formation du complexe enzyme-anticorps-antigène en présence de l'antigène de *Giardia* et du *Conjugué*.

MATÉRIAUX FOURNIS

CONJ	ENZ	Conjugué , 7,0 mL (anticorps polyclonal de lapin contre l'antigène de surface cellulaire de <i>Giardia</i> dans une solution de protéine tampon avec 0,02% thimerosal)*
DIL	SPE	Diluant , 50 mL (solution de protéine tampon avec 0,02% thimerosal)*. Le <i>Diluant</i> est aussi utilisé comme solution de <i>Contrôle Négatif</i> (Voir la PROCÉDURE du test).
H ₂ SO ₄	0.6N	Solution d'Arrêt , 7 mL, (0,6N d'acid sulfuric). ATTENTION: Éviter tout contact avec la peau; rincer immédiatement en cas de contact. Mot indicateur : Danger H314 : Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501
CONTROL	+	Contrôle Positif , 3,5 mL (antigène de <i>Giardia</i> dans une solution de protéine tampon avec 0,02% thimerosal)*
SUBS	REAG	Substrat , 14 mL (solution contenant du tétraméthylbenzidine et du peroxyde)
WASHBUF	20X	Tampon de Lavage à Concentration 20X , 50 mL (concentré 20X contenant du tampon salin aux phosphates, du détergent, et 0,2% thimerosal)*. Mot indicateur : Avertissement H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée P260, P314, P501
MA	PLT	Plaque de Microdosage , 12 bandes, chacune consiste de 8 puits recouverts avec l'anticorps monoclonal contre l'antigène de surface cellulaire de <i>Giardia</i> . (préserver avec matériel déshydratant)



2 Feuille adhésive en plastique

100 pipettes graduées disponibles

*contient du mercure



MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Bouteille pour solution de nettoyage
950 mL d'eau distillée pour diluer la solution de nettoyage
Lecteur Elisa capable de mesurer à 450 nm ou 450/620 nm
Tubes d'analyses

Mélangeur vortex
Récipient pour déchets
Papier absorbant
Bâtons applicateurs

PRÉCAUTIONS

- Exclusivement réservé à une utilisation diagnostique *in vitro*.
- Les réactifs provenant de kit différents ne doivent pas être mélangés. N'utiliser pas le kit après sa date d'échéance.
- Les réactifs doivent être à température ambiante avant utilisation.
- Les chapeaux et les bouts de pipettes sont codé par couleur: ne les mélangez pas.
- Chaque composant du kit doit être inspecté pour vérifier qu'il n'y a pas de signes de fuites. À l'arrivée, le kit doit être inspecté pour s'assurer que les composants ne sont pas congelés ou chaud au touché, ce qui pourrait être causé par des conditions de transports inadéquates.
- Quand vous manipulez les puits d'analyses, évitez d'égratiner le fond des puits parce que des mesures élevées d'absorbance peuvent résulter.
- La bouteille de compte-gouttes doit être maintenue verticalement pour obtenir une goutte de taille appropriée.
- Les micropuits inutilisés doivent être placés à l'intérieur de la poche rescellable avec le déshydratant pour les protéger de l'humidité.

9. Exécuter la procédure de nettoyage tel qu'il a été décrit pour éviter des réactions non-spécifiques élevées.
10. Le *Substrat* est sensible à la lumière et de doit donc être protégé contre la lumière direct du soleil ou des sources d'UV.
11. Des resultants optimaux sont obtenus en suivant la procédure du test spécifiée. Les concentrations, les conditions d'incubations, et les specifications des methods ont été élaborées pour optimiser la sensibilité et la spécificité du test.
12. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme tout facteur potentiel de transmission d'agents infectieux. S'équiper de gants jetables pendant le test.
13. Le *Tampon de lavage concentré 20X* contient du Thimérosal 0,2 % comme conservateur. Une fois diluée à une concentration normale d'utilisation, cette solution est classée comme non dangereuse. La *Solution d'arrêt* contient 0,6 N d'acide sulfurique. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. Les vêtements contaminés doivent être ôtés puis lavés avant d'être réutilisés. Manipuler les réactifs selon les réglementations existantes relatives à la sécurité des laboratoires et les bonnes pratiques de laboratoire. Les fiches de sécurité de ce produit sont disponibles à la demande. Contacter le support technique.
14. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets. Ne pas les jeter avec les déchets ménagers mais avec les matières dangereuses.

DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'échéance du kit est indiquée sur l'étiquette. La date d'échéance pour chaque composant est énumérée sur les étiquettes individuellement. Le kit doit être stocké entre 2° et 8°C et doit être retourné au réfrigérateur aussitôt que possible après utilisation.

MANIPULATION DES SPÉCIMENS

1. Les procédures standard internes de collection et de manipulation utilisées pour les spécimens fécaux sont appropriées. Aucune modification des méthodes de collection utilisées pour l'examen par microscopie standard O&P est nécessaire. Les spécimens fécaux peuvent être utilisés non-préservés ou congelés, ou dans une solution de formol tamponnée à 10% ou dans du Sodium-Acétate-Formol (SAF).
2. Les spécimens non-préservés doivent être maintenus entre 2° et 8°C et analysés suivant les premières 24 heures après la collection. Les spécimens qui ne peuvent pas être analysés durant cette période doivent être stockés à -20°C ou moins jusqu'à ce qu'ils soient analysés.
3. Les spécimens préservés peuvent être maintenus à température ambiante et analysés pendant 18 mois après collection.
4. La concentration des spécimens fécaux ne sont pas nécessaires.
5. Assurez vous que les spécimens soient bien mélangés (vortexés) avant de faire l'analyse. Cela inclue le mélange complet du spécimen avant le transfert au *Diluant* et/ou au puit de micro-titre.
6. Toutes les dilutions doivent être faites avec le *Diluant*.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. Le contenu du kit doit être amené à température ambiante avant utilisation.
2. Préparer la Solution de Nettoyage 1X. Le *Tampon de Lavage à Concentration 20X* est fournis en concentré 20X (un précipité peu être apparent). Il doit être dilué pour atteindre un volume total de 1 litre en ajoutant 50 mL du concentré à 950 mL d'eau distillée. Marquer la bouteille. Stocker la *Solution de Nettoyage 1X* non-utilisée entre 2° et 8°C.

PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

1. Selles Fraîches/Congelées: Les spécimens fécaux congelés doivent être décongelés. Ajouter 400 µL de *Diluant* au tube de microcentrifuge (1 seul par specimen), puis ajouter 100 µL (2^{ème} marque sur la pipette graduée) d'échantillon au tube et mélanger complètement. Cela représente une dilution en rapport de 1:5. Si le spécimen ne peut

pas être transféré à l'aide d'une pipette, utiliser une tige d'application pour transférer environ 0,1 gram de matière fécale. Cela représente à peu près la taille d'un petit pois (environ 4 mm de diamètre). Faire la dernière dilution dans les puits de micro-titres comme il est indiqué dans la PROCÉDURE.

2. Selles Préservés: Mélanger (au vortex) le contenu du récipient avant le transfert du spécimen. Aucun traitement ou dilution additionnel est nécessaire. Faire la dernière dilution dans les puits de micro-titres comme il est indiqué dans la PROCÉDURE.

PROCÉDURE

1. Deux puits de contrôles doivent être utilisés à chaque fois qu'une analyse est performée. Ces puits sont utilisés comme contrôles positifs et négatifs. Un puits est nécessaire pour chaque échantillon à tester. Maintenir la bouteille verticalement en ajoutant les gouttes. Des marques d'identification peuvent être écrites directement sur le côté des puits. Ajouter 1 goutte (50 µL) du *Contrôle Positif* (chapeau noire) au puits pour le contrôle positif et 2 gouttes (100 µL, la 2^{ème} marque sur la pipette graduée) du contrôle négatif (c.a.d., de *Diluant*) au puits pour le contrôle négatif.
2. Si des échantillons frais ou congelés (c.a.d. non-préservés) doivent être utilisés, préparer une dilution à 1:5 de l'échantillon tel qu'il est décrits dans PRÉPARATION DES SPÉCIMENS ci-dessus.
3. Transférer 100 µL de *Diluant* à chaque puits d'analyse sur la *Plaque de Microdosage*. En utilisant des pipettes en plastique, transférer 1 goutte (50 µL, 1^{er} marque sur la pipette graduée) d'échantillon (préservé ou dilué) à chaque puits d'analyse (auquel le *Diluant* a déjà été ajouté) et doucement tapoter les puits pour mélanger leur contenus. Sceller avec le couvert pour la plaque et incubé pour une heure à température ambiante.
4. Agiter le contenu hors des puits d'analyse dans le récipient pour déchets. Nettoyer chaque puit en utilisant la *Solution de Nettoyage 1X* dans une bouteille d'éjection à ouverture réduite, en dirigeant la *Solution de Nettoyage* au fond du puit vigoureusement. Remplir les puits, puis secouer la solution de lavage hors des puits dans un récipient pour déchets. Rabattre la plaque inversée sur une serviette en papier sèche et refaites l'étape de nettoyage trois fois (pour un total de 4 lavages) en utilisant une serviette en papier sèche à chaque fois. Si des particules de matière fécale sont encore dans les puits, continuer le lavage de la plaque jusqu'à ce qu'elle apparaisse propre.
5. Après le nettoyage, éliminer complètement le liquide résiduel dans les puits en rabattant la plaque sur une serviette en papier sèche jusqu'à ce que tout liquide ait été supprimé. Disposer des serviettes en papier d'un façon appropriée.
6. Ajouter 1 goutte (50 µL) de *Conjugué* (chapeau rouge) à chaque puits et doucement tapoter pour mélanger. Fermer hermétiquement à l'aide d'un film adhésif. Incuber les puits pendant 30 minutes à température ambiante.
7. Répéter la procédure de nettoyage (étapes 4 et 5).
8. Ajouter 2 gouttes (100 µL) de *Substrat* (chapeau bleu) à chaque puits. Doucement tapoter pour mélanger. Incuber les puits à température ambiante pendant 10 minutes.
9. Ajouter 1 goutte (50 µL) de *Solution d'Arrêt* (chapeau jaune) à chaque puit. Doucement tapoter les puits et attendre 2 minutes avant de faire une mesure. L'addition de la *Solution d'Arrêt* convertit la couleur bleu en une couleur jaune, qui peut être dosé en mesurant l'absorbance à 450 nm sur un lecteur microplaque ELISA. L'instrument doit être calibré à son zéro en utilisant l'air. Essayer le dessous de chaque puit avant la mesure de l'absorbance. Si un lecteur dual est utilisé, le zéro est fait à 620 nm et la mesure à 450 nm. L'aspect visuel de l'échantillon doit aussi être noté. Faire la mesure pendant les 10 minutes après l'addition de la *Solution d'Arrêt*.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

1. Un contrôle positif et négatif doit être fait avec chaque série d'analyses de spécimens.
2. Chaque puit de contrôle positif doit avoir une couleur jaune visible évidente et doit produire une absorbance de 0,500 ou plus. Un puit indiquant une mesure positive sans

avoir, toutefois, une couleur jaune visible doit être remplacé, essuyé en dessous, et mesuré une fois de plus.

3. Les puits de contrôle négatifs ne doivent présenter aucune couleur ou, alors, peuvent avoir une couleur jaune faible mais qui ne dépasse pas une valeur d'absorbance $< 0,150$ en lisant sur un lecteur à longueur d'onde unique (DO_{450nm}) ou $< 0,090$ en lisant avec un lecteur à longueur d'onde double ($DO_{450/620nm}$).
4. Les résultats des analyses ne sont pas valide à moins que les caractéristiques de performances des contrôle positifs et négatifs soient établis. Si ces résultats ne sont pas observés, appeler les Services Techniques.
5. Les résultats des analyses de même que les valeurs d'absorbance des contrôles doivent être enregistrés et rapporté de manière conforme avec les procédures normales internes et doivent être stocké d'une manière conforme avec les procédures internes normales pour future référence.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Absorbance		Couleur Visuelle	Interprétation
450 nm	450/620 nm		
$< 0,150$	$< 0,090$	Claire ou faiblement jaune	Négatif - En dessous de la limite de détection de l'analyse
$\geq 0,150$	$\geq 0,090$	Jaune pale ou jaune prononcé	Positif - Le spécimen contient l'antigène <i>Giardia</i>

Interprétation visuelle

Négatif: Un échantillon sans couleur ou possédant une couleur dont l'intensité ressemble à celle du puit de contrôle négatif.

Positif: Un échantillon qui est clairement plus jaune comparé au puit pour contrôle négatif.

NOTER: Le contrôle négatif, de même que certains puits d'analyse, peuvent indiquer une couleur légèrement jaune. Un puit d'analyse doit être clairement plus jaune que le puit pour contrôle négatif pour être évalué comme résultat positif.

Interprétation de la Spectrophotométrie.

1. Déterminer la valeur de l'absorbance pour le contrôle négatif. La mesure du contrôle négatif doit être $< 0,150$. Sinon l'analyse n'est pas valide et doit, donc, être répétée en faisant attention à la procédure de nettoyage.
2. Les mesures pour le *Contrôle Positif* doivent être supérieures à 0,500.
3. Les résultats d'analyse
Négatif: $< 0,150$ (absorbance à 450 nm) ou $< 0,090$ (absorbance à 450/620 nm)
Positif: $\geq 0,150$ (absorbance à 450 nm) ou $\geq 0,090$ (absorbance à 450/620 nm)

LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

1. Le test de *GIARDIA IITM* détecte la présence de l'antigène de *Giardia* dans les spécimens fécaux. Cet antigène est présent en particulier dans la forme kyste du parasite.
2. Les résultats des analyses doivent être interprétés par un médecin en considérant les autres résultats du laboratoire et l'histoire clinique.
3. Les spécimens fécaux concentrés ne doivent pas être analysés par le test de *GIARDIA IITM* et ne fourniront pas des résultats reproductibles et utiles.
4. La valeur prédictive d'un résultat positif diminue quand l'analyse adresse une population à prédominance faible.
5. Le test de *GIARDIA IITM* représente une détection qualitative de l'antigène de *Giardia* dans les spécimens fécaux. Il n'a pas été évalué pour la détection quantitative de l'organisme, et la mesure de l'absorbance n'a pas de corrélation avec la charge de l'organisme.

LES VALEURS ANTICIPÉES

Les individus normaux et en bonne santé ne devraient pas être infecté par *Giardia* et devraient produire un résultat d'analyse négatif par le test de *GIARDIA II*TM. Un résultat d'analyse positif par le test de *GIARDIA II*TM indique que l'individu produit des quantités détectables de l'antigène de *Giardia*. L'incidence d'infection par *Giardia* varie de manière significative parmi les populations et entre différentes locations géographiques. Les enfants dans un environnement de type grégaire (école, etc.) sont exposés à des taux d'infection par *Giardia* supérieur comparé à la population normale (21). De plus, les hommes homosexuels démontrent des taux supérieur d'infection (22).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Dans une étude faite à TECHLAB, Inc. le test de *GIARDIA II*TM a été évalué en utilisant des spécimens fécaux frais et des spécimens fécaux préservés dans 10% de Formaline ou FAS. Les spécimens utilisés dans l'étude ont été identifiés *Giardia*-positifs par microscopie par des laboratoires externes. Les spécimens provenaient de patients entre trois et quatre-vingts ans. Parmi les 203 spécimens analysés, 110 étaient déterminés positifs par microscopie. Le test de *GIARDIA II*TM a détecté tous les 110 spécimens positifs. Un total de 93 spécimens négatifs ont aussi été testés. Tous les spécimens *Giardia* négatifs ont été déterminés négatifs par le test de *GIARDIA II*TM. Les résultats sont présentés dans la Table 1.

Table 1. Comparaison entre le test de *GIARDIA II*TM et microscopie (n=203).

		Microscopie	
		+	-
<i>GIARDIA II</i> TM	+	110	0
	-	0	93

Sensitivité	100%
Spécificité	100%
Valeur Prédictive Positive	100%
Valeur Prédictive Négative	100%
Corrélation	100%

Dans des études internes additionnelles, le *GIARDIA II*TM kit a été comparé à un autre ELISA commercial en utilisant des spécimens fécaux frais et des spécimens préservés dans 10% de Formaline ou FAS. Les spécimens utilisés dans l'étude ont été identifiés *Giardia*-positifs par microscopie par des laboratoires externes. Parmi les 128 spécimens analysés, 88 ont été déterminés positifs par microscopie. Le test de *GIARDIA II*TM a détecté tous les 88 spécimens positifs, alors que l'autre ELISA commercial n'a détecté que 86 des 88 spécimens. Un total de 40 spécimens négatifs ont été testés. Tous les spécimens *Giardia*-négatifs étaient négatifs par le test de *GIARDIA II*TM et par l'autre ELISA commercial. Les résultats sont présentés dans la Table 2.

Table 2. Comparaison entre un autre ELISA commercial et le test de *GIARDIA II*TM avec la microscopie (n=128).

L'autre ELISA Commercial		Microscopie	
		+	-
	+	86	0
	-	2	40

<i>GIARDIA II</i> TM		Microscopie	
		+	-
	+	88	0
	-	0	40

	L'autre ELISA Commercial	<i>GIARDIA II</i> TM
Sensitivité	97,7%	100%
Spécificité	100%	100%
Valeur Prédictive Positive	100%	100%
Valeur Prédictive Négative	95,2%	100%
Corrélation	98,4%	100%

RÉACTIONS CROISÉES

Le test de *GIARDIA II*TM a été évalué en utilisant des spécimens fécaux déterminés positifs pour une variété de pathogènes intestinaux. Aucune réaction croisée n'a été observée avec des spécimens fécaux contenant l'un (ou plus) des pathogènes suivants. Le nombre de spécimens testés pour chaque organisme est indiqué entre parenthèses.

<i>Ascaris lumbricoides</i> (2)	<i>Blastocystis hominis</i> (8)	<i>Chilomastix mesnili</i> (2)
<i>Clonorchis</i> (1)	<i>Cryptosporidium parvum</i> (8)	<i>Dientamoeba fragilis</i> (3)
<i>Endolimax nana</i> (3)	<i>Entamoeba coli</i> (4)	<i>Entamoeba hartmanii</i> (2)
<i>Entamoeba histolytica</i> (2)	Hookworm (2)	<i>Iodamoeba butchlii</i> (2)
<i>Isospora belli</i> (2)	Rotavirus (11)	<i>Schistosoma mansoni</i> (2)
<i>Strongyloides stercoralis</i> (3)	<i>Trichuris trichiura</i> (2)	

PRÉCISION - INTER-ANALYSE

Pour la détermination de la performance d'inter-analyse, quatre spécimens fécaux positifs et quatre négatifs étaient analysés cinq fois au total durant une période de cinq jours en utilisant le test de *GIARDIA II*TM. Le % Coefficient de Variation (CV) des spécimens positifs se trouvait entre 3,5 et 8,0, avec une moyenne de 5,2. Le % CV des spécimens négatifs se trouvait entre 3,4 et 14,9, avec une moyenne de 8,3.

PRÉCISION - INTRA-ANALYSE

Le % Coefficient de Variation (CV) d'intra-analyse était déterminé en analysant quatre spécimens fécaux positifs et quatre négatifs. Chaque spécimen était analysé dans 12 puits d'analyse. Le % Coefficient de Variation (CV) des spécimens positifs se trouvait entre 2,9 et 11,4, avec une moyenne de 7,1. Le % CV des spécimens négatifs se trouvait entre 7,9 et 36,9, avec une moyenne de 22,8.

FOR INFORMATIONAL USE
ONLY

FOR INFORMATIONAL USE
ONLY

REFERENCES

1. Erlandsen, L. S., E. A. Meyer (Ed.). 1984. *Giardia* and giardiasis: biology, pathogenesis and epidemiology. Plenum Press, New York.
2. World Health Organization Scientific Working Group. 1980. Parasite-related diarrhoeas. Bull W.H.O. 58:819-830.
3. Petersen, H. 1972. Giardiasis (lambliasis). Scand. J. Gastroenterol. 7 (Suppl 14):1-44.
4. Craun, G. F. 1979. Waterborne outbreaks of giardiasis. In Jakubowski, W., J. Hoff (Ed.), Waterborne transmission of giardiasis. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., pp. 127-149.
5. Brodsky, R. E., H. C. Spencer, and M. G. Schultz. 1974. Giardiasis in American travelers to the Soviet Union. J. Infect. Dis. 130:319-23.
6. White, K. E., C. W. Hedberg, L. M. Edmons, D. B. W. Jones, M. T. Osterholm, and K. L. MacDonald. 1989. An outbreak of giardiasis in a nursing home with evidence for multiple modes of transmission. J. Infect. Dis. 160:298-304.
7. Pickering, L. K., W. E. Woodward, H. L. DuPont, and P. Sullivan. 1984. Occurrence of *Giardia lamblia* in day care centres. J. Ped. 104:522-526.
8. Stevens, D. P., and A. A. Mahmoud. 1980. Giardiasis: the rediscovery of an ancient pathogen. Curr. Clin. Top. in Infect. Dis. 1:195-207.
9. Phillips, S. C., D. Mildvan, and D. C. Williams. 1981. Sexual transmission of enteric protozoa and helminths in a venereal disease clinic population. New Eng. J. Med. 305:603-606.
10. Friend, D. S. 1966. The fine structure of *Giardia muris*. J. Cell Biol. 29:317-332.
11. Faubent, G. M. 1988. Evidence that giardiasis is a zoonosis. Parasitol. Today 4:66-89.
12. Raizman, R. E. 1976. Giardiasis: an overview for the clinician. Digest. Dis. 21:70-74.
13. Kay, R., G. L. Barnes, and R. R. W. Townley. 1977. *Giardia lamblia* infestation in 154 children. Aust. Paed. J. 13:98-104.
14. Sun, T. 1980. The diagnosis of giardiasis. Am. J. Surg. Path. 4:265-271.
15. Burke, J. A. 1977. The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 7:373-391.
16. Kamath, K. R., and R. Murugasu. 1974. A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrhoeal disease and malabsorption. Gastroenterology 66:16-21.
17. Allison, M. C., E. L. Green, D. N. Bhattacharya, A. Smith, and R. E. Pounder. 1988. A microscopic and immunodiagnostic search for giardiasis in patients with gastrointestinal disorders. Scan. J. Gastroenterol. 23:209-212.
18. Nash, T. E., D. A. Herrington, and M. M. Levine. 1987. Usefulness of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Giardia* antigen in faeces. J. Clin. Microbiol. 27:1169-1171.
19. Janoff, E. N., J. C. Croft, L. K. Pickering, T. Novotny, M. J. Blaser, C. V. Knisley, and L. B. Reller. 1989. Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite specific antigens. J. Clin. Microbiol. 27:431-435.
20. Stibbs, H. 1989. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for *Giardia lamblia* antigen in human stool. J. Clin. Microbiol. 27:2582-2588.
21. Novotny, T. E., R. S. Hopkins, P. Shillam, E. N. Janoff. 1990 Prevalence of *Giardia lamblia* and risk factors for infection among children attending day-care facilities in Denver. Public Health Rep. 105(1): 72-5.
22. William D.C. 1981. Enteric Diseases. Cutis. 27(3):278-81, 283-5.

Technical Support

Advice Line

Further information can be obtained from your distributor, or by contacting Alere Technical Support on:

US	+ 1 877 866 9335	TS.SCR@alere.com
Africa, Russia, CIS	+972 8 9429 683	ARCISproductsupport@alere.com
Asia Pacific	+61 7 3363 7711	APproductsupport@alere.com
Canada	+1 800 818 8335	CANproductsupport@alere.com
Europe & Middle East	+44 161 483 9032	EMEproductsupport@alere.com
Latin America	+57 2 6618797	LAPRODUCTSUPPORT@alere.com

The Alere Logo and Alere are trademarks of the Alere group of companies.

GIARDIA II, the TECHLAB Logo and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc., under license.

© 2015 TECHLAB, Inc. All rights reserved.