

Antygen *Giardia lamblia* - ELISA

Zestaw do wykrywania antygenu *Giardia lamblia* w kale metodą ELISA

Tylko do diagnostyki in vitro



Nr kat. GL2-96

96 oznaczeń

ZASTOSOWANIE

Zestaw służy do wykrywania antygenu *Giardia lamblia* w kale metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

WSTĘP

Giardia lamblia jest pasożytniczym pierwotniakiem odpowiedzialnym za giardiozę. Objawami choroby są: biegunka, nudności, utrata wagi, zaburzenia wchłaniania, skurcze jelit, wzdęcia oraz anemia.¹ Choroba może przebiegać w sposób ostry, przewlekły lub bezobjawowy. Giardioza jest najbardziej rozprzestrzenioną chorobą w USA. Notowane jest około 100 milionów łagodnych i 1 milion ostrych infekcji każdego roku.²

Głównymi szlakami zakażenia *Giardia* są cysty dostające się do organizmu drogami oralno-fekalnymi. Epidemie giardiozy notowano w żłobkach i przedszkolach w wyniku picia zakażonej wody.^{1,2} Żłobki i przedszkola mogą być pośrednio i bezpośrednio odpowiedzialne za 45% zdiagnozowanych zakażeń *Giardia* w USA.³ W wyniku badań oszacowano zachorowalność 54% dzieci w żłobkach / przedszkolach.¹

Kolejnym źródłem zakażenia są kontakty homoseksualne między mężczyznami. Szacuje się, że 5-19% tej populacji jest zakażone.⁴

Diagnoza zakażenia *Giardia* odbywa się przy pomocy licznych inwazyjnych lub nieinwazyjnych technik. Wśród technik nieinwazyjnych najczęściej stosowane jest badanie mikroskopowe kału. Metoda ta polega jednak w znacznym stopniu na doświadczeniu stosującego ją pracownika laboratorium. W związku z obserwowaną niską skutecznością tej metody i sporadycznym uwalnianiem się pasożytów opracowano inne metody diagnostyczne.^{3,5,6,11}

Dobłą alternatywą okazało się opracowanie metody immunoenzymatycznej (ELISA) do badania próbek kału. Testy ELISA wykazują czułość porównywalną z badaniem mikroskopowym wykonanym przez doświadczonego pracownika laboratorium, są proste w wykonaniu i nie wymagają obserwacji całych organizmów.^{5,6,7,12}

ZASADA METODY

Podczas pierwszej inkubacji antygeny *Giardia* wychwytywane są z próbki kału przez przeciwciała związane na dolkach mikropłytki. Dolki są poddane inkubacji i myciu przed dodaniem przeciwciał anti-*Giardia* sprzężonych z peroksydazą (konjugat). Następnie konjugat wiąże antygeny przyłączone do dolków mikropłytki. Po odpłukaniu niezwiązanych składników dodawany jest chromogen, który reaguje z nadtlakiem wodoru przy udziale peroksydazy dając barwny (niebieski) produkt. Roztwór hamujący zatrzymuje reakcję i zmienia kolor z niebieskiego w żółty. Jeśli antygeny nie zostały związane bądź poziom związanych antygenów jest niewystarczający nie zajdzie barwna reakcja.

SKŁAD ZESTAWU

MI PLATE - paski testowe - dolki mikropłytki (96 sztuk) umieszczone w uchwycie, opłaszczone monoklonalnymi przeciwciałami anti-*Giardia*

CONJ - koniugat - 1 butelka 11 ml zawierająca roztwór peroksydazy sprzężonej z poliklonalnymi przeciwciałami anti-*Giardia* i thimerosal

CONTROL / + - Kontrola pozytywna - 1 fiolka zawierająca 2 ml formalinowanego supernatantu kału, z antygenami *Giardia*

CONTROL / - - Kontrola negatywna - 1 fiolka zawierająca 2 ml buforu do rozcieńczenia

CHROMOGEN - 1 butelka 11 ml zawierająca roztwór tetrametylobenzidyny (TMB) i nadtlak wodoru

WASH Concentrate (20x) - Płyn płuczący - 2 butelki (25ml) 20 x stężonego buforu, zawierające detergenty i thimerosal

DILUTION BUFFER - Bufor rozcieńczający - 4 butelki zawierające po 30 ml buforowanego roztworu białka i thimerosalu

STOP Solution - Roztwór hamujący reakcję - 1 butelka zawierająca 11 ml 5% kwasu fosforowego

OSTRZEŻENIA

1. Przestrzegać procedury w trakcie wykonywania testu. Wszelkie odstępstwa od przedstawionej procedury w czasach/temperaturach inkubacji oraz płukaniach mogą oddziaływać na czułość i specyficzność testu.

2. Test tylko do zastosowań diagnostyki in vitro.

3. Nie mieszać reagentów pomiędzy zestawami o różnych numerach serii.

4. Nie używać odczynników, po terminie ważności

5. Dolki, które nie są używane należy przechowywać w szczelnie zamkniętym opakowaniu.

6. Nie używać odczynników mętnych lub zawierających strąty. Wyjątek stanowi stężony płyn płuczący (WASH CONCENTRATE), w którym po przechowywaniu w lodówce mogą pojawić się strąty znikające po ogrzaniu.

7. Nie stosować azydów jako konserwantów zarówno do próbek jak i reagentów.

8. Kontrole i niektóre odczynniki zawierają thimerosal jako konserwant, który może powodować podrażnienia skóry, oczu i błon śluzowych. W przypadku kontaktu z odczynnikami należy przepłukać oczy i skórę dużą ilością wody.

9. Wszystkie reagenty i próbki traktować jako materiał potencjalnie zakaźny. Unikać powstawania aerozolu i odpowiednio usuwać rozlane próbki.

10. Roztwór zatrzymujący reakcję jest 5% roztworem kwasu fosforowego. Jeśli dojdzie do kontaktu ze skórą spłukać miejsce kontaktu dużą ilością wody. W przypadku kontaktu z oczami postąpić podobnie i skonsultować się z lekarzem.

11. Osoby, które nie rozpoznają kolorów lub z upośledzeniem ich rozpoznawania nie mogą odczytywać wizualnie testu. Do odczytu powinny używać czytnika.

PRZECHOWYWANIE

Składniki zestawu przechowywać w temp. 2-8 °C.

Rozcieńczony płyn płuczący może być przechowywany w temperaturze pokojowej (15-25°C).

PRZYGOTOWANIE ZESTAWU

Przed użyciem zestaw należy doprowadzić do temperatury pokojowej a roztwory dokładnie wymieszać.

Przygotowanie płynu płuczącego

Koncentrat roztworu płuczającego (WASH CONCENTRATE 20X) może wytrącać się podczas przechowywania w lodówce, ale natomiast po doprowadzeniu do temperatury 15-25°C i wymieszaniu wraca do pierwotnego stanu. Przed użyciem upewnić się czy koncentrat jest dokładnie wymieszany i ma postać płynu. Zawartość butelki z płynem płuczającym przenieść do butelki zawierającej 475 ml wody dejonizowanej i dokładnie wymieszać.

POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Pobieranie próbek kału

Stosować podstawowe techniki pobierania próbek kału do badań na obecność pasożytów. Oznaczenia można wykonywać na próbkach nieutrwalonych, po zamrożeniu jak i po utrwaleniu 10% formaliną, odczynnikiem Cary-Blair lub SAF. Nieutrwalone próbki należy przechowywać w temp. 2-8 °C i oznaczyć w ciągu 24 godzin. Probki, które będą oznaczane po dłuższym okresie, należy zamrozić i przechowywać w temp. -20°C lub niższej. Zamrożenie nie wpływa na wynik testu. Probki utrwalone w formalinie lub SAF mogą być przechowywane w temp. 15-25°C lub 2-8°C i oznaczone w czasie 18 miesięcy od momentu pobrania. Nie należy zamrażać utrwalonych próbek. Unikaj wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek. Probki przechowywane w Cary-Blair należy trzymać w 2-8°C lub w -20°C i oznaczyć w ciągu 1 tygodnia od pobrania. Unikaj rozmrażania i ponownego zamrażania próbek.

Rozcieńczenia nieutrwalonego kału wykonywać przy pomocy buforu rozcieńczającego (Dilution Buffer). Nie używać buforów z zestawu o innym numerze serii.

WYKONANIE OZNACZENIA

Materiały dostarczone

Patrz punkt SKŁAD ZESTAWU

Dodatkowe materiały i wyposażenie

Pipety, tryskawka, cylinder miarowy, woda dejonizowana, wymazówki do pobrania materiału oraz próbki do jego rozcieńczenia.

Zaleca się stosowanie czytnika (z filtrami 450 i 620-630 nm) i płuczki ELISA.

Temperatura inkubacji

Wszystkie inkubacje należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej (15-25°C).

Procedura wykonania

Uwagi

- Upewnić się, że wszystkie reagenty i próbki są doprowadzone do temp. pokojowej 15-25°C. Zamrożone próbki muszą zostać kompletnie rozmrożone.

- Jeżeli jest potrzeba, próbki mogą być skrośowane przy 2000-3000 g przez 5-10 min. Należy upewnić się, że supernatant jest przejrzysty.

- Unikać tworzenia się pęcherzyków powietrza w dolkach podczas

wykonywania oznaczenia co może wpływać na wyniki testu. Dokładnie wytrząsnąć resztki płynu płuczącego z dołków odciskając płytkę w ręcznik papierowy, co pozwala zminimalizować tworzenie się pęcherzyków powietrza.

- W każdym oznaczeniu należy uwzględnić kontrole. Kontrole są gotowe do użycia i nie należy ich rozcieńczać.

- Całość oznaczenia wykonywać w temperaturze pokojowej (15-25°C).

Rozcieńczenie w dołkach:

Należy wybrać odpowiednią metodę wykonania rozcieńczenia próbki (punkty – 2 – 4) a następnie kontynuować procedurę od punktu 5 do 13:

1. Odpowiednią ilość dołków (plus 2 dla kontroli) umieścić w uchwycie.

2. W probówkach przygotować rozcieńczenie próbek (0,3 ml buforu rozcieńczającego + 0,1 g, wielkości niewielkiego ziarna grochu próbki kału. Dokładnie wymieszać przed użyciem.

- W przypadku używania wymazówki należy dodać pipetą 0,6 ml buforu rozcieńczającego do próbki a następnie zanurzyć wymazówkę w cienkiej warstwie kału i przenieść do próbki z buforem rozcieńczającym. Dokładnie wymieszać.

3. Wodniste nieutrwalone próbki wymieszać dokładnie, 0,1 ml próbki dodać do 0,3 ml buforu rozcieńczającego znajdującego się w probówce.

4. W przypadku próbek utrwalonych w SAF lub 10% Formalinie lub Clary-Blair wymieszać dokładnie pojemnik. Dodatkowe czynności nie są wymagane.

5. Dodać 100 µl kontroli negatywnej do dołka #1 i 100 µl kontroli pozytywnej do dołka #2 używając mikropipety.

6. Dodać po 50 µl buforu rozcieńczającego do kolejnych dołków. Nie dodawać buforu do dołków z kontrolami.

7. Dodać 50 µl uprzednio przygotowanej próbki do dołków z buforem rozcieńczającym.

8. Inkubować 60 min. w temp. pokojowej (15-25 °C), a następnie odplukać używając płynu płuczącego*. Przejść do punktu 9.

Rozcieńczenie w probówkach:

Należy wybrać odpowiednią metodę wykonania rozcieńczenia próbki (punkty – 2 – 4) a następnie kontynuować procedurę od punktu 5 do 13:

1. Odpowiednią ilość dołków (plus 2 dla kontroli) umieścić w uchwycie.

2. W probówkach przygotować rozcieńczenie próbek (0,7 ml buforu rozcieńczającego + 0,1 g, wielkości niewielkiego ziarna grochu próbki kału). Wymieszać dokładnie przed użyciem.

- W przypadku używania wymazówki dodać pipetą 1 ml buforu rozcieńczającego do próbki a następnie zanurzyć wymazówkę w cienkiej warstwie kału i przenieść do próbki z buforem rozcieńczającym. Dokładnie wymieszać.

3. Wodniste nieutrwalone próbki wymieszać i 0,1 ml próbki dodać do 0,7 ml buforu rozcieńczającego umieszczonego w probówce. Dokładnie wymieszać.

4. W przypadku próbek utrwalonych w SAF lub 10% Formalinie czy Clary-Blair wymieszać dokładnie pojemnik a następnie 0,2 ml próbki wymieszać z 0,3 ml buforu rozcieńczającego w probówce.

5. Dodać 100 µl kontroli negatywnej do dołka #1 używając mikropipety.

6. Dodać 100 µl kontroli pozytywnej do dołka #2 używając mikropipety.

7. Dodać 100 µl uprzednio przygotowanej próbki do każdego dołka.

8. Inkubować 60 min. w temp. pokojowej (15-25 °C), a następnie odplukać używając płynu płuczącego*. Przejść do punktu 9.

9. Dodać 2 krople (po 100) µl koniugatu do każdego dołka.

10. Inkubować 30 minut w temp. pokojowej, a następnie odplukać*.

11. Dodać 2 krople (po 100 µl) Chromogenu do każdego dołka.

12. Inkubować 10 minut w temp. pokojowej.

13. Dodać po 100 µl roztworu zatrzymującego reakcję do każdego dołka. Dokładnie wymieszać zawartość płytki (czas mieszania 15 sekund). Odczytać wynik po 5 min. wizualnie lub za pomocą czytnika do mikropłytek przy długości fali 450/620-650 nm.

* - Plukanie dołków mikropłytki wykonać pięciokrotnie, przez energiczne naplanianie każdego z dołków aż do przelania i opróżnianie ich. Jeśli to możliwe unikać tworzenia się pęcherzyków w dołkach ponieważ może to prowadzić do zafałszowania wyników.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Kontrola Jakości

Kontrole pozytywne i negatywne należy wykonywać w każdym oznaczeniu. Stosowanie kontroli pozwala na łatwą walidację stabilności testu.

- **Kontrola negatywna** czytana wizualnie powinna być bezbarwna natomiast na czytniku mikropłytek powinna pokazać wartość < 0,08 OD odczyt przy dl fali 450 /620-650 nm.

- **Kontrola pozytywna** czytana wizualnie powinna być wyraźnie żółta, na czytniku powinna mieć wartość > 0,5 O.D.

Odczyt wizualny

Wynik pozytywny: zabarwienie dołków z próbkami wyraźnie bardziej żółty niż kontrola negatywna.

Wynik negatywny: zabarwienie dołków z próbkami wyraźnie mniej żółty niż kontrola negatywna.

UWAGA! Kontrole negatywne i niektóre próbki mogą dawać lekko żółte zabarwienie. Aby próbkę określić jako pozytywną musi być ona wyraźnie ciemniejsza od kontroli negatywnej.

Odczyt przy pomocy czytnika

Czytnik wyzerować na pustym dołku A1. Wyniki odczytać przy długości fali: filtr główny - 450 nm, filtr tła - 620-630 nm.

Wynik pozytywny – O.D. ≥ 0,08 - próbka zawiera antygen *Giardia*.

Wynik negatywny – O.D. < 0,08 - próbka nie zawiera antygenu *Giardia* na wykrywalnym poziomie.

OGRANICZENIA METODY

1. Wyniki oznaczenia należy traktować jako pomoc w diagnozie. Uzyskane wyniki pozytywne należy potwierdzić inną metodą.

2. Nie zagęszczać próbek. Zagęszczanie może powodować uzyskanie nieprawdziwych wyników.

3. Próbki, które zawierają antygeny na poziomie niższym od limitu detekcji będą dawały wynik negatywny. U chorych, u których istnieje podejrzenie obecności *Giardia* zaleca się wykonywanie oznaczania próbek pobieranych przez kolejne dni.

WARTOŚCI REFERENCYJNE

U zdrowych osób nie stwierdza się obecności *Giardia*, a test powinien dawać wynik negatywny. Przy pozytywnym wyniku testu stwierdza się występowanie antygenów *Giardia* w kale. W niektórych populacjach (homoseksualiści, złobki / przedszkola) częstotliwość zakażeń może być wyższa (patrz literatura).

CHARAKTERYSTYKA WYKONANIA

Badania #1

Badania wykonano w firmie IVD Research, Inc. używając próbek świeżych, zamrożonych i utrwalonych w 10% Formalinie, i SAF. Z 90 przebadanych próbek, 26 określono jako pozytywne i 64 jako negatywne.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli:

	Badania mikroskopowe +	Badania mikroskopowe -
IVD Giardia +	26	0
IVD Giardia -	0	64

Czułość: 100% (26/26)

Specyfność: 100% (64/64)

Badania #2

Badania wykonano w firmie IVD Research, Inc. używając próbek świeżych, zamrożonych i utrwalonych w 10% Formalinie i SAF, a następnie porównano z wynikami uzyskanymi z zastosowaniem innego komercyjnie dostępnego testu Giardia ELISA Z 86 przebadanych próbek, 22 określono jako pozytywne i 64 jako negatywne.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli:

	IVD Research, Inc.	
	+	-
Inny test ELISA +	22	0
Inny test ELISA -	0	64

Pomiędzy tymi dwoma testami ELISA zgodność wyników pozytywnych wyniosła 100% (22/22), a negatywnych 100% (64/64).

Powtarzalność

CV pomiędzy oznaczeniami poszczególnymi dołków obliczono używając 4 pozytywnych i 4 negatywnych próbek 24-krotnie oznaczonych w jednym powtórzeniu. Otrzymano średnie CV 3,67% a najwyższe 6,18%.

CV pomiędzy oznaczeniami w poszczególnych seriach obliczono używając 4 pozytywnych i 4 negatywnych próbek oznaczonych w powtórzeniach wykonanych w ciągu 3 dni. Otrzymano średnie CV 4,08% a najwyższe 11,61%.

Reakcje krzyżowe

Nie stwierdzono reakcji krzyżowych z następującymi organizmami:

Entamoeba hartmanni, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Chilomastix mesnili*, *Strongyloides stercoralis*, *Cryptosporidium*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Diphyllobothrium* species, *Hymenolepis nana*, *Clonorchis sinensis*, *Enteromonas hominis*, *Trichuris trichiura*, *Iodamoeba buetschlii*, Hookworm, *Schistosoma mansoni*, rotavirus, *Taenia* eggs.

Kierownik Pionu Przetargów
BioMaxima S.A.
Anna Mianowany

Za zgodność
z oryginałem

Fasciola eggs, *Isospora belli*, *Entamoeba polecki*, Adenovirus oraz 33 inne gatunki bakterii (lista dostępna na życzenie).

Rozwiązywanie problemów

PROBLEM: Kontrola negatywna daje zbyt wysokie OD (jest wyraźnie żółta)
PRZYCZYNA: Nieodpowiednie płukanie
CO POPRAWIĆ: Należy przepłukiwać paski z mikrodolkami bardziej energicznie i usuwać nadmiar płynu z dołków przez stukanie do góry nogami płytki na stole z rozłożonym ręcznikiem papierowym. Nie dopuszczać do wyschnięcia dołków.

Literatura

1. Black, R. et. al.: Giardiasis in Day-Care Center: Evidence of Person to Person Transmission. *Pediatric*, #60 (4), October 1977, pp. 486-491.
2. Craun, G.: Waterborne Giardiasis in the United States. *Lancet*, August 30, 1986, pp. 513-514.
3. Smith, J.: Identification of Fecal Parasites in the Special Parasitology Survey of the College of American Pathologist, ALCP, Vol. 72 (2) August 1979, pp. 371-373.
4. Kappus, K. and Juranek, D.: *Giardia* in the Well. *JAMA*, March 25, 1988, Vol. 259 (12), pp. 1810.
5. Allison, M.C. et. al.: A Microscopic and Immunodiagnostic Search for Giardiasis in Patients with Gastrointestinal Disorders. *Scan J Gastroenterol*, 1988 #23, pp. 209-212.
6. Nash, T., Herrington, D. and Levine, M.: Usefulness of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Giardia* Antigen in Feces. *J Clin Micro*, July 1987, Vol. 25 (7), pp. 1169-1171.
7. Green, E. Miles, M., and Warhurst, D.: Immunodiagnostic Detection of *Giardia* Antigen in Faeces by a Rapid Visual Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Lancet*, Sept. 28, 1985, pp. 691-693.
8. Peters, C. et al.: Prevalence of Enteric Parasites in Homosexual Patients Attending an Outpatient Clinic. *J Clin Micro*, Oct. 1986, Vol. 24 (4), pp. 684-685.
9. Intestinal Protozoa: Cinderellas of Parasitology. *ASM News*, Vol. 52 (10), 1986, pp. 521-522.
10. Burke, J.: Giardiasis in Childhood. *Am J Dis Child*, Nov. 1975, Vol. 129, pp. 1304-1310.
11. Danciger, M. and Lopez, M.: Numbers of *Giardia* in the Feces of Infected Children. *Am J Trop Med Hyg.*, Vol. 24 (2), 1975, pp. 237-242.
12. Ungar, B. et. al.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of *Giardia* *Lambia* in Fecal Specimens. *J Infect Dis.*, January 1984, Vol. 149 (1), pp. 90-97.

STOSOWANE SYMBOLE GRAFICZNE - OBJAŚNIENIA

- | | |
|--|---|
|  | - zawartość |
|  | - numer katalogowy |
|  | - przed użyciem zapoznać się z instrukcją |
|  | - wyrób do diagnostyki in vitro |
|  | - temperatura przechowywania |
|  | - producent |
|  | - numer serii |
|  | - data ważności |

PN 3724 Rev.4
GL2-96

Kierownik Pionu Przetargów
BioMaxima S.A.
Anna Mianowany

Za zgodność
z oryginałem