

RIDASCREEN® Giardia

N.º producto: C1101



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemania
Teléfono: +49 (0) 61 51 - 81 02-0/Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20



1. Uso previsto

Para diagnósticos *in vitro*. RIDASCREEN® Giardia es un inmunoensayo enzimático para la identificación cualitativa de *Giardia lamblia* en muestras de heces humanas.

2. Resumen y descripción del ensayo

Giardia lamblia son parásitos flagelados que causan infecciones en los intestinos delgados de humanos después de la ingestión por vía oral de quistes de Giardia. El patógeno *Giardia lamblia* tiene una amplia distribución mundial y es, por tanto, una causa significativa de diarrea crónica, especialmente en casos médicos relacionados con viajes. La infección tiene lugar después de ingerir los quistes con alimentos o agua contaminada. El patógeno *Giardia lamblia* es la principal causa de enfermedad con diarrea derivada de la ingesta de agua contaminada en EE.UU. En países subdesarrollados, la infección con Giardia es una de las principales causas de diarrea en niños de menos de diez años, con una prevalencia de 15 – 20%. La giardiasis (lambliasis) se manifiesta en forma de diarrea aguda o crónica y las personas asintomáticas pueden excretar también los quistes del parásito. El periodo de incubación es de 3 a 42 días.

La infección aguda se caracteriza por los siguientes síntomas: episodios repentinos de diarrea acuosa (heces frecuentemente de color amarillo, consistencia espumosa y olor desagradable acompañadas de flatulencia), pérdida de apetito, náuseas, letargo y pérdida de peso.

En el pasado, el principal método de diagnóstico de lambliasis consistía en examinar las muestras de heces al microscopio para detectar los quistes, cosa que requiere disponer de personal experimentado. Puesto que la frecuencia de excreción de los quistes puede variar enormemente, los tests deben realizarse además sobre una secuencia de numerosas muestras de heces durante un largo periodo de tiempo.

3. Principio de ensayo

En el ensayo RIDASCREEN® Giardia se utilizan anticuerpos específicos según el método tipo sandwich. La superficie de los pocillos de la placa está recubierta con anticuerpos específicos de Giardia contra los antígenos específicos de quistes y trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Una suspensión de la muestra de heces analizada y las muestras control se pipetea en los pocillos de la placa junto con anticuerpos anti-Giardia (conjugado 1) y se incuba todo a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Después de un paso de lavado, se añade conjugado de poliperoxidasas y estreptavidina (conjugado 2) y se incuba nuevamente a temperatura ambiente (20 - 25 °C). En las muestras que contienen el antígeno de *Giardia lamblia*, el anticuerpo inmovilizado, el antígeno de *Giardia lamblia* y el anticuerpo conjugado forman un complejo tipo sandwich. En el siguiente paso de lavado se elimina el conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina no unido. En las muestras positivas, la adición de un sustrato

provoca que la coloración de la solución con el enzima unido vare de incolora a azul. La adición de un reactivo de parada provoca que la coloración cambie de azul a amarillo. La extinción es proporcional a la concentración de antígenos de *Giardia lamblia* presentes en la muestra.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.

Plate	96	Placa de pocillos, 12 tiras de pocillos (divisibles) en el portatiras; recubiertos con los anticuerpos monoclonales específicos contra los antígenos específicos de <i>Giardia lamblia</i> .
Diluent 1	100 ml	Tampón de dilución de muestra, solución salina tamponada con proteína, lista para usar, color azul.
Wash	100 ml	Tampón de lavado, solución salina tamponada con fosfato (concentración 10x); contiene timerosal 0,1 %.
Control +	2 ml	Antígeno de <i>Giardia lamblia</i> inactivado; listo para usar.
Control -	2 ml	Control negativo (tampón de dilución de muestra), listo para usar.
Conjugate 1	13 ml	Anticuerpos monoclonales conjugados con biotina contra los antígenos específicos de <i>Giardia lamblia</i> en solución proteica estabilizada; listo para usar, color rojo.
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina en solución proteica estabilizada, listo para usar, color naranja.
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrógeno/TMB; listo para usar.
Stop	12 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N, listo para usar.

5. Reactivos y almacenamiento

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 - 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Si se almacena a 2 - 8 °C, el tampón de lavado diluido puede utilizarse como máximo durante 4 semanas. Evitar la contaminación microbiana. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, no es posible garantizar la calidad.

Abrir la bolsa de aluminio con tijeras sin que se rompa el precinto de seguridad. Retornar las tiras de pocillos que no se necesiten a la bolsa de aluminio y guardarlas inmediatamente a 2 - 8 °C. El sustrato incoloro debe protegerse de la luz directa para evitar la descomposición o el viraje a color azul por efecto de la autooxidación. No utilizar el sustrato si ha virado a color azul.

6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

6.1. Reactivos suministrados

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Tubos de ensayo
- Pipetas desechables (ref. Z0001)
- Mezclador de vórtice (opcional, ver 9.3.)
- Micropipeta de 50 - 100 µl y 1 ml
- Probeta (1.000 ml)
- Cronómetro
- Dispositivo de lavado de placas de pocillos o pipetas multicanal (300 µl)
- Fotómetro para placas de pocillos (450 nm y filtro de referencia de 620 - 650 nm)
- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito 0,5%

7. Precauciones para usuarios

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso de este ensayo.

No pipetear las muestras y los reactivos con la boca y evitar el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Llevar equipo de protección personal (guantes, bata, gafas de protección) al manipular las muestras y lavar las manos después de finalizar el ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en que se procesen las muestras.

Para más información, consultar la hoja de datos de seguridad (MSDS) en www.r-biopharm.com.

El kit incluye un control positivo que contiene el antígeno de Giardia inactivado. Debe tratarse como material potencialmente infeccioso y manejarse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad nacionales, igual que las muestras de los pacientes.

El tampón de lavado contiene timerosal 0,1 % como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel o con las mucosas.

Los reactivos y el material usados deben desecharse de forma correcta y responsable. Respetar la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Guardar el material del ensayo a 2 - 8 °C hasta que se vaya a usar. Si el material no puede utilizarse en ensayos hasta dentro de tres días, recomendamos almacenarlo a como mínimo a -20

almacenarlo a como mínimo a -20 °C. No congelar y descongelar la muestra innecesariamente.

No guardar las muestras de heces y los frotis rectales en recipientes de transporte que contengan materiales con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el ELISA RIDASCREEN® Giardia.

En caso de utilizar frotis rectales, comprobar si el volumen de material fecal es suficiente (aprox. 100 mg) para el ensayo.

La localización de contactos debe incluir muestras de heces de personas contactadas que no presenten síntomas clínicos para poder identificar portadores asintomáticos.

9. Procedimientos de ensayo

9.1. Información general

Los reactivos y pocillos **Plate** deben adquirir temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de la utilización. No sacar las tiras de pocillos de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado temperatura ambiente. Mezclar a fondo los reactivos inmediatamente antes de usarlos. Después de usar, almacenar las tiras de pocillos (en bolsas de aluminio) y los reactivos a 2 - 8 °C. Desechar las tiras de pocillos usadas. No utilizar los reactivos y las tiras de pocillos en caso si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.

Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los componentes del kit.

No realizar el ensayo en condiciones de luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de pocillos o el precinto con un envoltorio plástico para evitar pérdidas por evaporación.

9.2. Preparación del tampón de lavado

Mezclar 1 parte de tampón de lavado concentrado **Wash** con 9 partes de agua destilada. Calentar previamente el concentrado en baño maría a 37 °C para disolver los posibles cristales presentes.

9.3. Preparación de las muestras

Llenar un tubo de ensayo etiquetado con un 1 ml de tampón de dilución de muestra RIDASCREEN® **Diluent | 1**. Utilizar una pipeta desechable (ref. Z0001) para extraer una muestra de heces fluida (aprox. 100 µl) hasta justo por encima de la segunda marca y añadirla al tampón del tubo de ensayo para formar una suspensión. Para suspender muestras de heces sólidas, utilizar una cantidad equivalente de la muestra (aprox. 50 - 100 mg) con una espátula

o un asa de siempre desechable. Homogeneizar la suspensión de heces mediante aspiración y eyección con una pipeta desechable o mediante agitación en un mezclador de vórtice. Dejar reposar brevemente (10 min.) la suspensión para que sedimenten las partículas de heces gruesas; el sobrenadante clarificado de la suspensión puede usarse directamente en el ensayo. Si el procedimiento de ensayo se realiza en un sistema ELISA automatizado, el sobrenadante debe estar libre de partículas. En este caso, es recomendable centrifugar la muestra a 2.500 G durante 5 minutos.

Nota:

Las muestras de heces diluidas en **Diluent | 1** pueden analizarse en todos los RIDASCREEN® ELISA para los que se utilice **Diluent | 1**.

9.4. Primera incubación

Después de llenar un número suficiente de pocillos del portatiras, pipetear 100 µl del control positivo **Control | +**, del control negativo **Control | -** o de la suspensión de muestras de heces a los pocillos. Acto seguido, añadir 100 µl del anticuerpo conjugado con biotina **Conjugate | 1** y mezclar (golpeando suavemente contra un lado de la placa); incubar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 60 minutos.

9.5. Lavado

Es fundamental realizar un lavado exhaustivo si quieren obtenerse resultados correctos y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente los pasos de lavado especificados en las instrucciones. Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos para eliminarlas de acuerdo con la normativa local en materia de eliminación de residuos. Acto seguido, sacudir la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad restante. A continuación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado cada vez. Después de cada paso de lavado, sacudir los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que están completamente vacíos.

Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas o un equipo ELISA automático, comprobar si el equipo está ajustado correctamente; solicitar los ajustes al fabricante, si es preciso. Los equipos suministrados por R-Biopharm están programados con ajustes y protocolos de trabajo validados. A fin de no bloquear las boquillas de lavado, utilizar solamente suspensiones de heces libres de partículas (ver punto 9.3., Preparación de las muestras). Verificar asimismo que se ha aspirado completamente el líquido en cada paso de lavado.

9.6. Segunda incubación

Pipetear 100 µl de conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina **Conjugate | 2** en los pocillos e incubar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 15 min.

9.7. Lavado

Lavar según se ha descrito en el punto 9.5.

9.8. Tercera incubación

Llenar todos los pocillos con 100 µl de sustrato **Substrate**. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 15 minutos en la cámara oscura. A continuación, llenar todos los pocillos con 50 µl de reactivo de parada **Stop** con objeto de detener la reacción. Después de mezclar con precaución golpeando suavemente contra un lado de la placa, medir la extinción a 450 nm (opcionalmente a 450/620 nm). Ajustar el punto cero en el aire, es decir, sin la placa de pocillos.

Nota:

En las muestras de pacientes con positivo alto pueden formarse precipitados de sustrato de color negro.

10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos

A efectos de control de calidad, deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que se realice el ensayo con objeto de garantizar que los reactivos son estables y que el ensayo se realiza correctamente. El ensayo se habrá realizado correctamente si la tasa de extinción (DO) de control negativo es menor que 0,2 a 450 nm (menor que 0,160 a 450/620 nm) y el valor medido para el control positivo es mayor que 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valor mayor que 0,2 (0,160) para el control negativo puede indicar que el lavado no ha sido suficiente. Las desviaciones de los valores requeridos, como turbidez o coloración azul del sustrato incoloro antes de introducirlo en los pocillos, puede indicar que los reactivos han caducado. Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Procedimiento de ensayo correcto
- Comprobación visual de contaminación o pérdidas en los componentes del kit. No utilizar soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del corte

Con objeto de establecer el corte, se añaden 0,15 unidades de extinción a la extinción medida para el control negativo.

$$\text{Corte} = \text{extinción del control negativo} + 0,15$$

11.2. Resultados del ensayo

La evaluación de la muestra es **positiva** si la tasa de extinción supera en más del 10 % el valor de corte calculado.

La evaluación de la muestra es **marginal** si la tasa de extinción está dentro de un rango 10 % menor a 10 % mayor que el valor de corte. Si la repetición de la prueba de una muestra de heces fresca cae nuevamente dentro de la zona gris, la evaluación de la muestra es negativa.

Las muestras con extinciones inferiores en más del 10 % al valor de corte calculado deben considerarse **negativas**.

12. Limitaciones del método

El test RIDASCREEN® Giardia identifica los antígenos específicos de *Giardia lamblia* en muestras de heces. El nivel de extinción determinado no puede asociarse a la presencia o gravedad de los síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro y los síntomas clínicos.**

Un resultado **positivo** no permite descartar la presencia de otros patógenos infecciosos.

Un resultado **negativo** no permite descartar la posibilidad de giardiasis. Este resultado puede deberse a la excreción intermitente del parásito o a que la cantidad de antígeno en la muestra sea demasiado pequeña. Si la historia del paciente da pie a sospechar una infección con *Giardia lamblia*, deberá repetirse la prueba con otra muestra de heces.

Un resultado **marginal** puede deberse a la distribución no homogénea de los parásitos en la muestra de heces. En este caso, deberá repetirse la prueba con una segunda suspensión de la misma muestra o solicitarse una nueva muestra.

13. Rendimientos

13.1. Estudio de comparación clínico

En una investigación clínica realizada en Gran Bretaña se evaluó el ensayo de RIDASCREEN® Giardia con un total de 240 muestras de heces (estudios prospectivos y retrospectivos ciegos). Se realizó una comparación con métodos de microscopía para Giardia usuales en Gran Bretaña (tinción con solución salina y yodo), así como una PCR diferencial en tiempo real. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Comparación del ELISA RIDASCREEN® Giardia mediante microscopía y PCR en tiempo real

		Microscopía		PCR en tiempo real [#]	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
RIDASCREEN® Giardia	Positivo	11	15	26	0
	Negativo	2	212	1	211

[#]Cantidad insuficiente de material en dos muestras de heces

IC: intervalo de confianza en %

Sensibilidad (IC):	85 % (55 - 98)	96 % (81 - 100)
Especificidad (IC):	93 % (89 - 96)	100 % (98 - 100)

13.2. Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del ELISA RIDASCREEN® Giardia se preparó una serie lineal de diluciones a partir de una muestra con una cantidad conocida de quistes de Giardia y se realizaron mediciones por triplicado. El límite de detección (LoD) es la última concentración que se evalúa como positiva en todas las réplicas. Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Resultados de sensibilidad analítica para ELISA RIDASCREEN® Giardia

Quistes/reacción	MV [DO 450/620]	Resultados
2,5 x 10 ⁵	1,793	Positivo
1,25 x 10 ⁵	0,968	Positivo
6,25 x 10 ⁴	0,460	Positivo
3,12 x 10 ⁴	0,201	Positivo
1,56 x 10 ⁴	0,077	Negativo
7812	0,024	Negativo
3906	0,008	Negativo

13.3. Precisión

Para determinar la reproducibilidad intraensayo se analizaron 40 réplicas de estas referencias, representativas del rango de medición completo, desde negativo a positivo alto. Se determinaron las medias y los coeficientes de variación (CV) para tres lotes de los kits. Para la reproducibilidad interensayo se analizaron referencias en forma de duplicados de diez días de trabajo diferentes, con dos ensayos por día. Las medidas fueron realizadas por tres técnicos

sobre tres lotes de los kits. Se determinó la reproducibilidad entre lotes para los tres lotes de kits. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Reproducibilidad/precisión del ELISA RIDASCREEN® Giardia

Referencia		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote de kit 1	Lote de kit 2	Lote de kit 3	Lote de kit 1	Lote de kit 2	Lote de kit 3	Lote de kit 1-3
1	MV [DO 450/620]	2,667	2,314	2,216	2,568	2,765	2,763	2,699
	CV (%)	5,67%	6,37%	12,03%	13,59%	11,04%	9,25%	11,85%
2	MV [DO 450/620]	2,115	1,750	1,563	1,894	2,085	2,043	2,008
	CV (%)	5,02%	8,17%	7,35%	15,08%	15,52%	12,89%	15,07%
3	MV [DO 450/620]	1,295	0,909	1,170	1,372	1,514	1,541	1,476
	CV (%)	9,52%	9,42%	20,29%	18,51%	12,92%	11,45%	15,30%
4	MV [DO 450/620]	0,829	0,683	0,817	0,880	0,956	0,983	0,940
	CV (%)	7,43%	10,59%	7,07%	16,11%	13,29%	11,95%	14,59%
5	MV [DO 450/620]	0,505	0,404	0,481	0,558	0,618	0,623	0,600
	CV (%)	8,92%	13,43%	12,97%	21,12%	18,94%	20,21%	20,49%
6	MV [DO 450/620]	0,269	0,167	0,291	0,311	0,350	0,349	0,336
	CV (%)	9,53%	16,41%	10,48%	22,22%	15,16%	21,00%	20,21%

13.4. Reactividad cruzada

Se analizaron diferentes microorganismos patógenos del tracto intestinal con el test RIDASCREEN® Giardia sin que pudiera observarse reactividad cruzada. Estos estudios se realizaron con suspensiones de bacterias o virus no diluidas con concentraciones de 10^6 a 10^9 organismos por ml. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos

Organismo	Origen	MV [DO 450/620]
Adenovirus	Sobrenadante de cultivo celular	-0,005
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultivo	-0,001
<i>Arcobacter butzleri</i>	Cultivo	-0,003
Astrovirus	Sobrenadante de cultivo celular	-0,001
<i>Bacillus cereus</i>	Cultivo	0,001
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultivo	-0,002

<i>Campylobacter coli</i>	Cultivo	0,001
<i>Campylobacter fetus subsp.</i>	Cultivo	0,001
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultivo	0,001
<i>Campylobacter lari subsp.</i>	Cultivo	0,006
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	Cultivo	0,001
<i>Candida albicans</i>	Cultivo	-0,001
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultivo	0,000
<i>Clostridium bifermentans</i>	Cultivo	-0,002
<i>Clostridium difficile</i>	Cultivo	-0,003
<i>Clostridium novyi</i>	Cultivo	-0,004
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultivo	-0,001
<i>Clostridium septicum</i>	Cultivo	-0,005
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultivo	-0,001
<i>Clostridium sporogenes</i>	Cultivo	-0,006
<i>Cryptosporidium muris</i>	Cultivo	-0,005
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cultivo	-0,003
<i>E. coli (EPEC)</i>	Cultivo	0,001
<i>E. coli (ETEC)</i>	Cultivo	0,002
<i>E. coli (STEC)</i>	Cultivo	0,000
<i>Entamoeba histolytica</i>	Cultivo	-0,002
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultivo	0,002
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultivo	-0,001
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultivo	0,001
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultivo	0,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo	0,006
Rotavirus	Sobrenadante de cultivo celular	-0,005
<i>Salmonella enteritidis</i>	Cultivo	0,000
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cultivo	0,000
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultivo	-0,001
<i>Shigella flexneri</i>	Cultivo	0,003
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo	0,001
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultivo	0,001
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultivo	-0,001
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultivo	0,000

13.5. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias no demostraron tener efectos en los resultados del ensayo al mezclarlas con muestras de heces positivas y negativas para Giardia en las concentraciones descritas:

sulfato de bario (18,5% p/p), loperamida (antidiarreico; 0,02% p/p), Pepto-Bismol (antidiarreico, 6,6% v/p), mucinas (5,0% p/p), ciclamato (edulcorante, 1,3% v/p), sangre humana (5,0% v/p), ácido esteárico y ácido palmítico (mezcla 1:1, 40,0% p/p), metronidazol (0,5) (antibiótico 3,0% v/p), diclofenaco (0,1% v/p).

Anexo

Símbolos específicos del ensayo:

Plate	Placa de pocillos
Diluent 1	Tampón de dilución de muestra
Wash	Tampón de lavado
Control +	Control positivo
Control -	Control negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Sustrato
Stop	Reactivo de parada

Bibliografía

1. Black, R. E. et al.: Giardiasis in day-care centers: Evidence of person-to-person transmission. *Pediatrics* 60 (No. 4), 486 - 491 (1977).
2. Craun, G. F.: Waterborne Giardiasis in the United States: A review. *Am. J. Pub. Health* 69 (No. 8), 817 - 819 (1979).
3. Nask, T. E. et al.: Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 156 (No. 6), 974 - 984 (1987).
4. Smith, H. V. et al.: *Giardia* and Giardiasis: What's in a name? *Microbiol. Eur.* 3 (No. 1), 22 - 29 (1995).
5. Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A.: *Giardia* and Giardiasis. *Adv. Parasitol.* 32, 71 - 160 (1993).
6. Xiao, L.: *Giardia* infection in farm animals. *Parasitology today* 10 (No. 11), 436 - 438 (1994).
7. Schunk, M. et al.: Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 389 – 391 (2001).