

RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I

REF PG1715



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel I ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* und *Dientamoeba fragilis* in humanen Stuhlproben. Die RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel I multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch Parasiten verursachten gastrointestinalen Infektion unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Giardia lamblia, *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis* und *Entamoeba histolytica* gehören zu den wichtigsten Diarrhoe verursachenden Protozoen. *Giardia lamblia* (auch *G. intestinalis* oder *G. duodenales* genannt) ist einer der häufigsten nicht-viralen Erreger von Durchfallerkrankungen. Laut CDC (Center for Disease Control) sind ca. 2 % aller Erwachsenen und 6 - 8 % der Kinder in Industrieländern sowie ca. ein Drittel aller Menschen in Entwicklungsländern mit *G. lamblia* infiziert.¹ Das CDC schätzt, dass jedes Jahr in den USA ca. 77.000 Fälle von Giardiasis (Lambliasis) auftreten.² Die Infektion erfolgt nach Aufnahme von Zysten aus kontaminiertem Trinkwasser, kontaminierten Lebensmitteln oder auf fäkal-oralem Weg von Person zu Person. Die Inkubationszeit beträgt 1 bis 3 Wochen. Die Giardiasis (Lambliasis) tritt als akute oder chronische Diarrhoe auf, wobei auch asymptomatische Zystenausscheider vorkommen. Symptome einer akuten Infektion sind plötzliches Auftreten einer wässrigen Diarrhoe, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Unterleibschmerzen und Gewichtsverlust.¹

Cryptosporidium parvum ist eine von mehreren Arten der Gattung *Cryptosporidium*. Neben *C. parvum* zählt *C. hominis* zu den häufigsten Verursachern einer Cryptosporidiose beim Menschen.⁴ Aber auch Infektionen durch weitere *Cryptosporidium* spp. wie z.B. *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, und *C. muris* können zu klinischen Symptomen führen.³ In den Industriestaaten wurden Cryptosporidien in bis zu 0,2 % bei gesunden Individuen und in etwa 2 % der Patienten mit Durchfällen nachgewiesen. In Entwicklungsländern liegt die Prävalenz mit bis zu 9 % sehr viel höher. Bei HIV infizierten Personen mit Durchfällen wurden bei 14 - 24 % der Fälle Cryptosporidien nachgewiesen, bei asymptomatischen HIV infizierten Personen in bis zu 5 %.^{5,6} Bei einem Ausbruch in Milwaukee (USA) im Jahr 1993 erkrankten mehr als 400.000 Menschen.⁴ Jedes Jahr treten in den USA schätzungsweise 748.000 Fälle von Cryptosporidiose auf.⁷ Die Infektion erfolgt überwiegend durch die Aufnahme der Oozysten durch kontaminiertes Wasser und Lebensmittel, aber auch fäkal-orale Schmierinfektionen von Mensch zu Mensch sind möglich. Bei immunkompetenten Menschen manifestiert sich die Cryptosporidiose nach 2 - 10 Tagen als wässriger Durchfall und kann von Übelkeit, Unterleibsschmerzen und Gewichtsverlust begleitet werden. Bei immunsupprimierten Menschen tritt oftmals ein schwerer Krankheitsverlauf auf, der mit einer lebensbedrohlichen chronischen Diarrhoe verbunden ist.^{2,4}

Entamoeba histolytica ist die einzige humanpathogene Spezies in der Gattung *Entamoeba* und Erreger der Amöbiasis. Die Infektion erfolgt fäkal-oral durch die Aufnahme der Zysten durch kontaminiertes Wasser und Lebensmittel, aber auch von Mensch zu Mensch. Während die meisten *E. histolytica* Infektionen asymptomatisch verlaufen, kommt es in ca. 10 % der Fälle zu einer Amöbenkolitis und in seltenen Fällen zu einer extraintestinalen Amöbiasis, überwiegend in der Leber (Amöbenleberabszess). Die klinischen Symptome der intestinalen Amöbiasis sind Bauchschmerzen und starke Durchfälle mit blutigen und schleimigen Stühlen. Die WHO schätzt, dass weltweit etwa 50 Millionen Menschen jährlich an invasiver Amöbiose erkranken, wovon ca. 100.000 versterben.^{2,8}

Dientamoeba fragilis ist weltweit verbreitet. Jüngste Studien haben sowohl das pathogene Potential von *D. fragilis* als auch den Erreger als häufige Ursache einer Gastroenteritis nachgewiesen. Eine Infektion mit *D. fragilis* kann entweder symptomatisch oder asymptomatisch verlaufen. Die Symptome der Dientamoebiasis sind Bauchschmerzen und Durchfall. Die Prävalenz von *D. fragilis* variiert von 0,3 % bis zu 52 % und übertrifft oft die von *Giardia lamblia*.^{9,10}

Klassisch erfolgt die Diagnose von *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. und *Dientamoeba fragilis* durch mikroskopische Untersuchung von Stuhlproben, wofür erfahrenes Personal zur Verfügung stehen muss. Die RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel I multiplex real-time PCR ist eine neue und attraktive Alternativmethode zur Untersuchung von Stuhlproben und hat sich als hoch sensitiv und spezifisch für den gleichzeitigen Nachweis der wichtigsten Durchfall verursachenden Parasiten (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* und *Dientamoeba fragilis*) erwiesen.

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel I ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* und *Dientamoeba fragilis* in humanen Stuhlproben. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente für *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* und *Dientamoeba fragilis* (ITS1-18S) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen von *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* und *Dientamoeba fragilis* werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel I multiplex real-time PCR Test enthält eine **Internal Control DNA** (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu **15 Mal** beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Präparation aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:3 mit Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 30 sec bei 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel I Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control DNA während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control DNA soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.**

Proben: Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.**

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR-Profil

Tab. 5: DNA real-time PCR-Profil für LightCycler® 480II

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung Annealing/Extension	10 sec, 95 °C 15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: DNA real-time PCR-Profil für Mx3005P

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung Annealing/Extension	15 sec, 95 °C 30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR-Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA® GENE DNA und RIDA® GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 7: Universal real-time PCR-Profil für LightCycler® 480II

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 8: Universal real-time PCR-Profil für Mx3005P

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	<i>Dientamoeba fragilis</i>	440/488	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	<i>Giardia lamblia</i>	465/510	
	ICD	533/580	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	533/610	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Dientamoeba fragilis</i>	ATTO	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none Die „Filter Set Gain Settings“ für ATTO müssen auf 8 eingestellt sein
	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	
	ICD	HEX	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Tab. 10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

**¹ Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten*

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

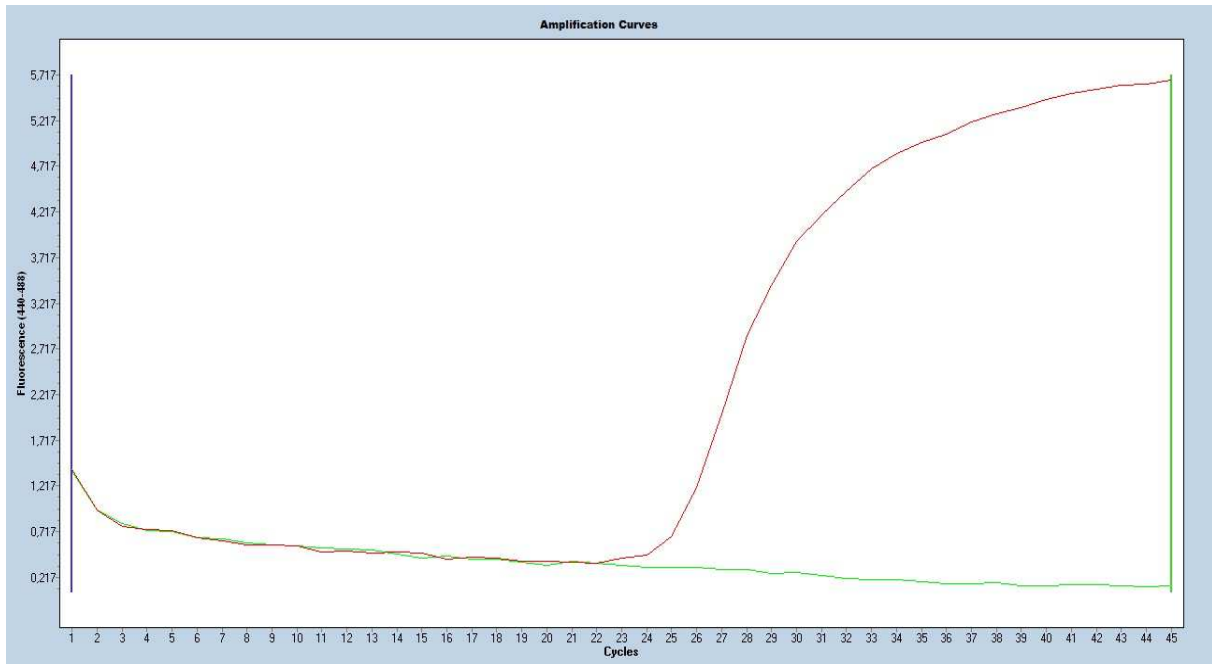


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Dientamoeba fragilis*) auf dem LightCycler® 480II

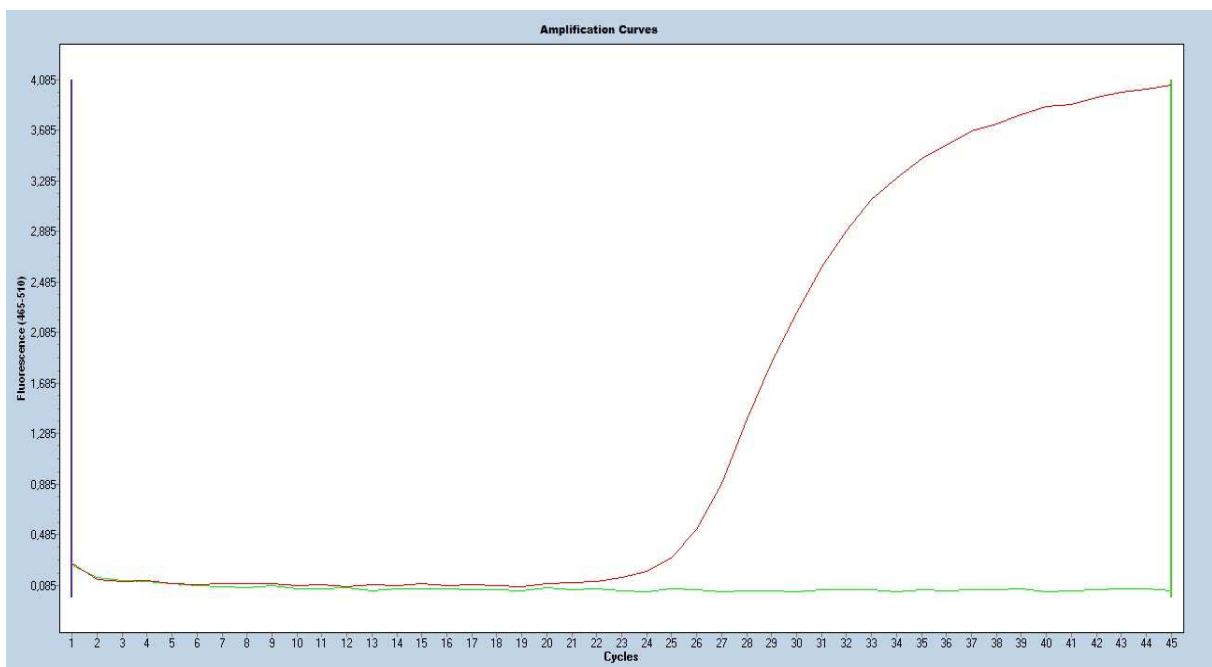


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Giardia lamblia*) auf dem LightCycler® 480II

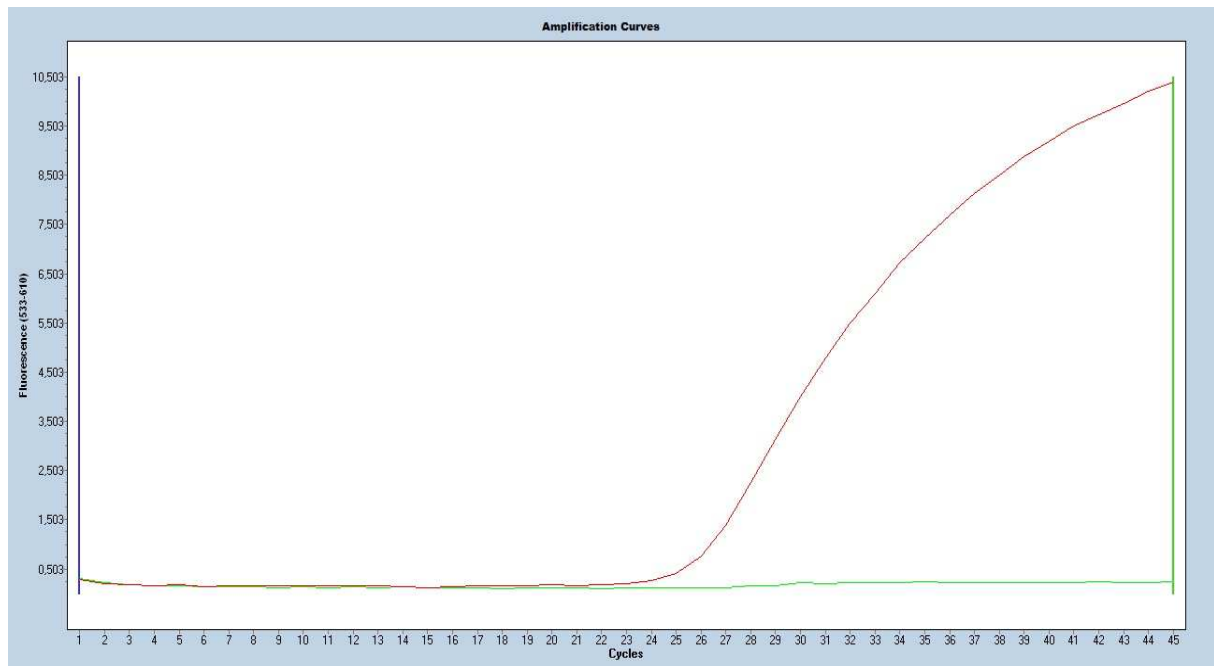


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Entamoeba histolytica*) auf dem LightCycler® 480II

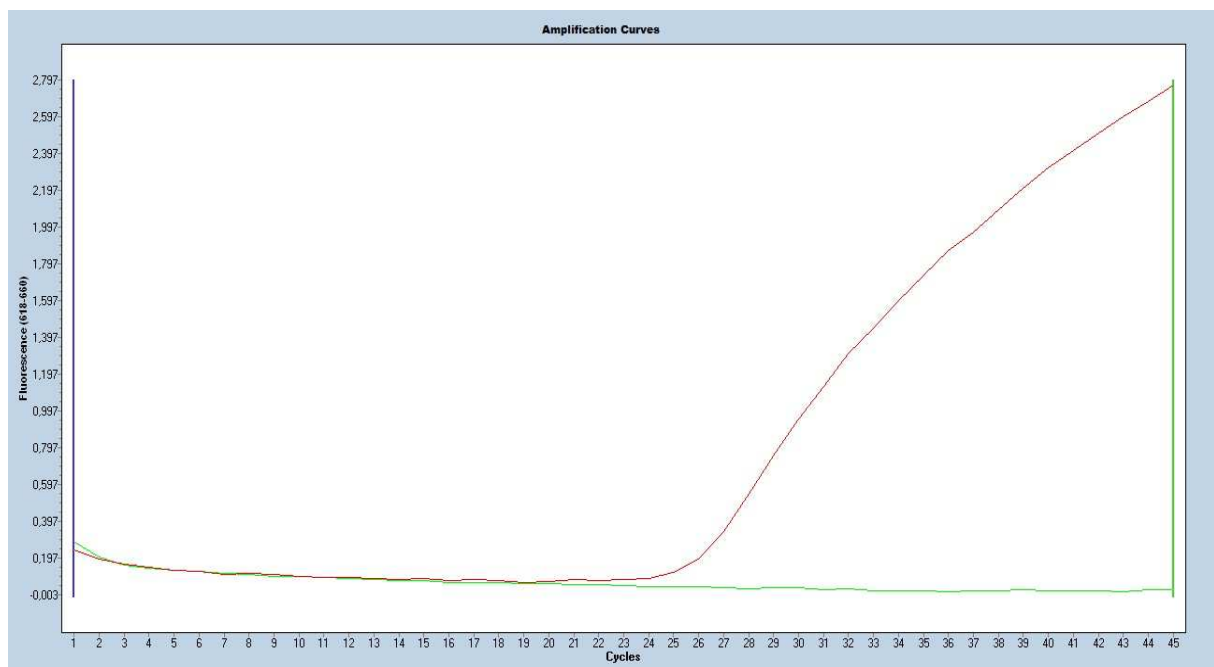


Abb. 4: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Cryptosporidium* spp.) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene				ICD	Ergebnis
<i>D. fragilis</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Crypto. spp.</i>		
positiv	negativ	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>D. fragilis</i> nachweisbar
negativ	positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>G. lamblia</i> nachweisbar
negativ	negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>E. histolytica</i> nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
positiv	positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>D. fragilis</i> und <i>G. lamblia</i> nachweisbar
positiv	negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>D. fragilis</i> und <i>E. histolytica</i> nachweisbar
positiv	negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>D. fragilis</i> und <i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
negativ	positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>G. lamblia</i> und <i>E. histolytica</i> nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>G. lamblia</i> und <i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>E. histolytica</i> und <i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
positiv	positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> und <i>E. histolytica</i> nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> und <i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>D. fragilis</i> , <i>E. histolytica</i> und <i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> und <i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> und <i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control DNA** jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der **Internal Control DNA** ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der **Internal Control DNA** führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control DNA** jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control DNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhlproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®] GENE Parasitic Stool Panel I multiplex real-time PCR Test zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (ITS1-18S) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Der RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I multiplex real-time PCR Test hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 DNA-Kopien/Reaktion für *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* und *Cryptosporidium* spp.

Die folgenden Abbildungen 5, 6, 7 und 8 zeigen Verdünnungsreihen von *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* und *Cryptosporidium* spp. (jeweils $10^5 - 10^2$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II.

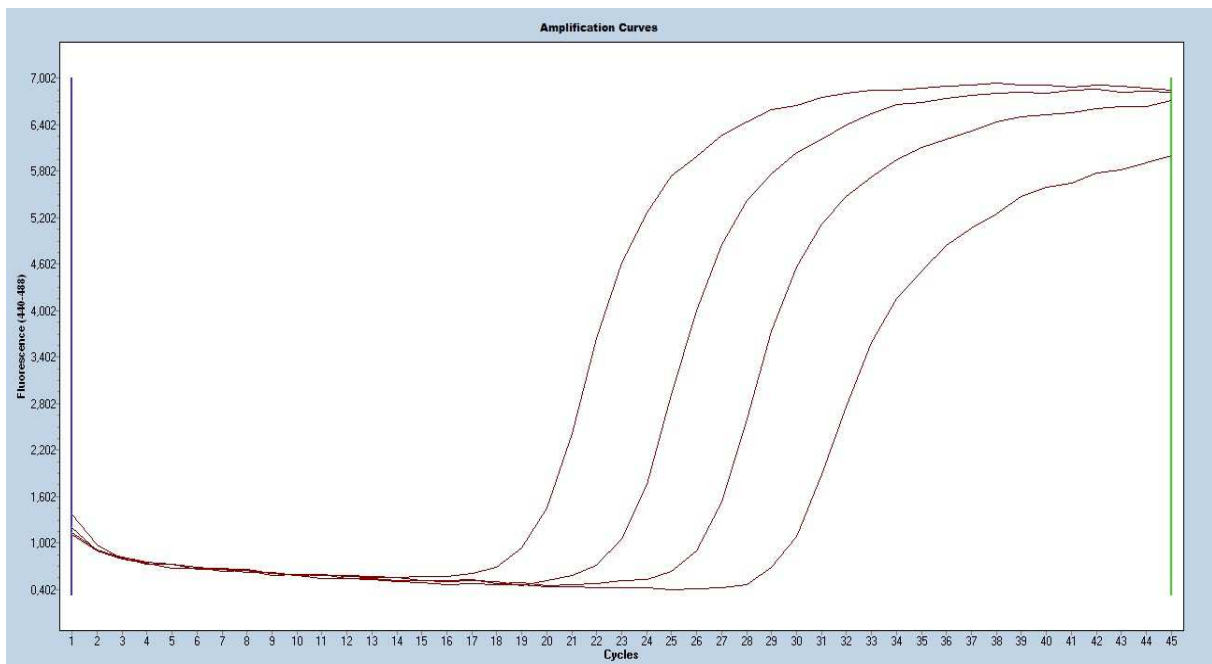


Abb. 5: Verdünnungsreihe *Dientamoeba fragilis* ($10^5 - 10^2$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

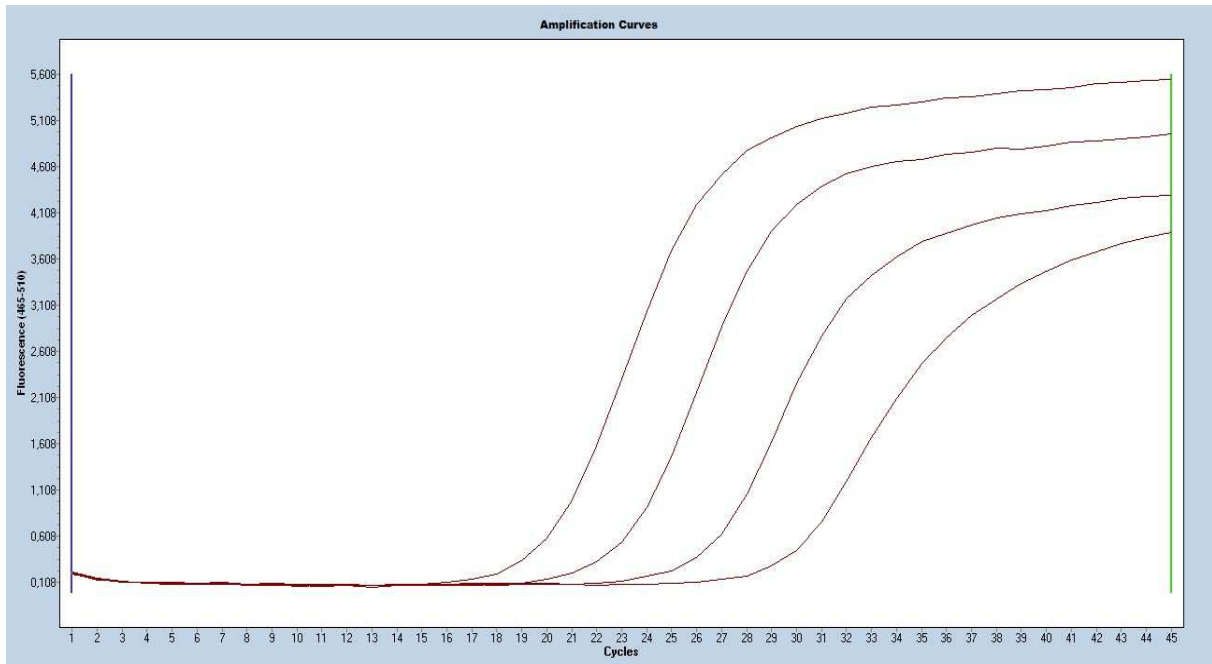


Abb. 6: Verdünnungsreihe *Giardia lamblia* ($10^5 - 10^2$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

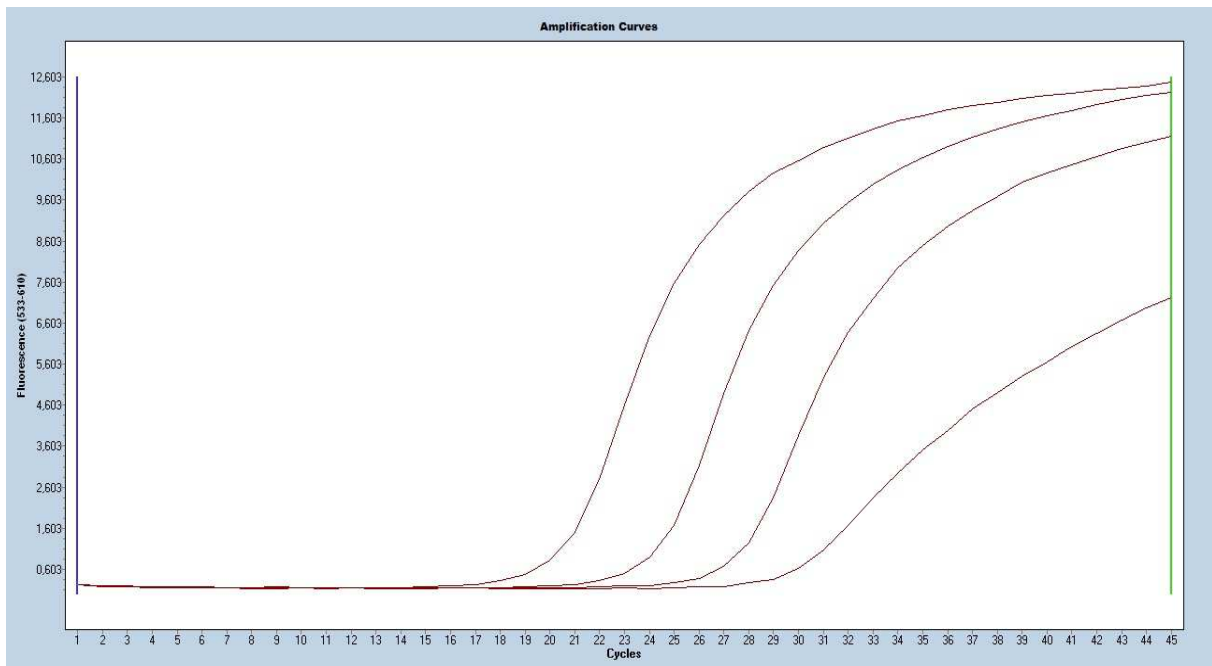


Abb. 7: Verdünnungsreihe *Entamoeba histolytica* ($10^5 - 10^2$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

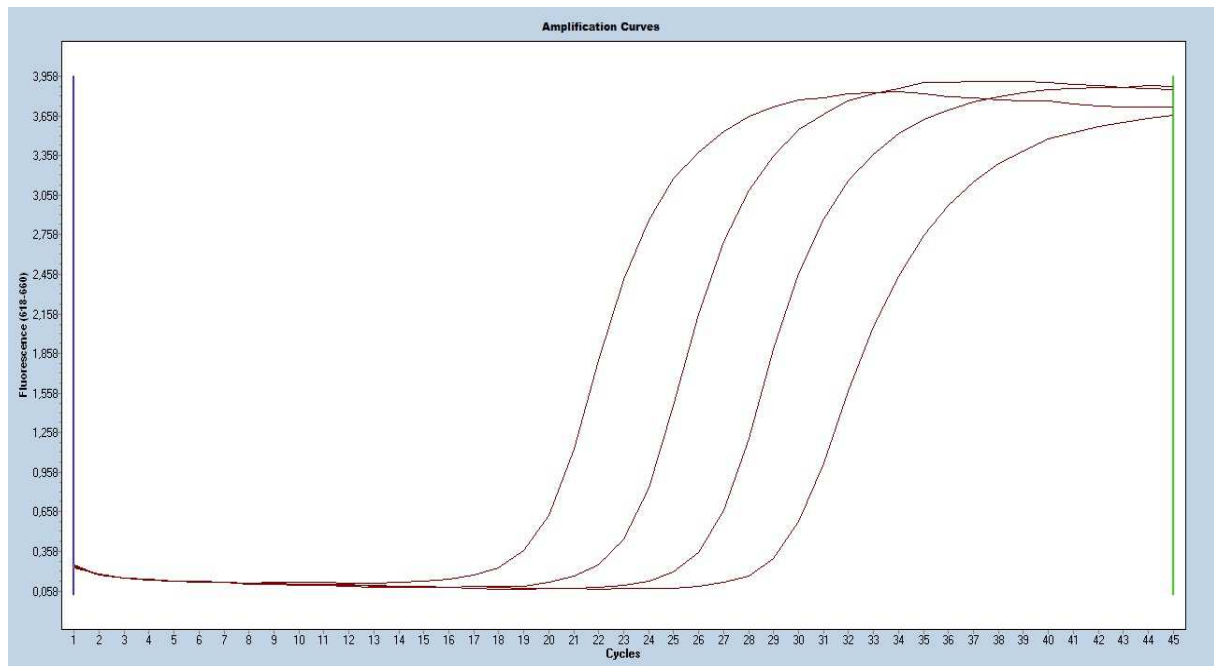


Abb. 8: Verdünnungsreihe *Cryptosporidium* spp. (10^5 - 10^2 DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, der DNA-Extraktion und dem DNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Der RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I multiplex real-time PCR Test ist spezifisch für *Dientamoba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* und *Cryptosporidium* spp. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

Tab. 12: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	Echovirus Type 11	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Enterovirus Type 71	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	Coxsackievirus B4	-	Norovirus GGII	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I multiplex real-time PCR Tests wurde mit *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* und *Cryptosporidium* spp. untersucht (s. Tab. 13). Die getesteten *Giardia lamblia*-, *Entamoeba histolytica*- und *Cryptosporidium* spp.-Stämme wurden mit dem RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I multiplex real-time PCR Test und mittels Sequenzabgleich (*) nachgewiesen.

Tab. 13: Analytische Reaktivitätstestung










<i>Giardia lamblia</i>					
<i>Giardia lamblia</i>	+	<i>G. intestinales</i> Portland 1	+	<i>G. intestinales</i> WB Clone 6	+
<i>Entamoeba histolytica</i>					
<i>E. histolytica</i>	+				
<i>Cryptosporidium</i> spp.					
<i>C. baileyi</i> *	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. sp skunk</i> *	+
<i>C. bovis</i> *	+	<i>C. muris</i>	+	<i>C. ubiquitum</i> *	+
<i>C. canis</i> *	+	<i>C. parvum</i>	+	<i>C. viatorum</i> *	+
<i>C. cuniculus</i> *	+	<i>C. sp horse</i> *	+	<i>C. xiaoi</i> *	+
<i>C. felis</i> *	+				

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-04-09	Generelle Überarbeitung 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 7. Vorsichtsmaßnahmen 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 11. Interpretation der Ergebnisse 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. Centers for Disease Control and Prevention 2011. Giardia Epidemiology & Risk Factors, <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>. Aufgerufen am 10.07.2012.
2. Food and Drug Administration (FDA) 2011. Bad Bug Book 2nd Edition. <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/default.htm>. Aufgerufen am 10.07.2012.
3. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>. Aufgerufen am 07.03.2014.
4. Leitch GJ und Qing He. Cryptosporidiosis - an overview. J Biomed Res. 2012, 25(1): 1-16.
5. Lee JK *et al.* Prevalence of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea . Korean J Parasitol. 2005, 43(3):111-114.
6. Robert Koch Institut 2010. Kryptosporidiose (*Cryptosporidium parvum*). RKI-Ratgeber für Ärzte 2004. Aufgerufen am 24.07.2012.
7. Scallan E *et al.* Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011, 17(1): 7-15.
8. Fotedar R *et al.* Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev. 2007, 20(3):511-532.
9. Stark D *et al.* A review of the clinical presentation of *dientamoebiasis*. Am J Trop Med Hyg. 2010, 82(4):614-9.
10. Baratt JLN *et al.* A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. Gut Microbes. 2011, 2(1):3-12.