

RIDA® UNITY Parasitic Stool Panel II

REF UN1725



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Deutschland

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



0123

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Test, welcher auf der RIDA®UNITY Plattform durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von *Giardia lamblia*-, *Cryptosporidium* spp.- und *Entamoeba histolytica*-DNA aus unbehandelten humanen Stuhlproben von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer gastrointestinalen Infektion.

Der RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von Parasiten-Infektionen (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. und *Entamoeba histolytica*) bei Patienten mit Symptomen einer gastrointestinalen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Parasiten-Infektion (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. und *Entamoeba histolytica*) nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für die professionelle Anwendung vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Giardia lamblia, *Cryptosporidium* spp. und *Entamoeba histolytica* gehören zu den wichtigsten Diarrhoe-verursachenden Protozoen.

Giardia lamblia, auch bekannt als *G. intestinalis* oder *G. duodenales*, verursacht weltweit Durchfallerkrankungen, die auch als Giardiasis bezeichnet werden. Jährlich werden etwa 500.000 neue Fälle gemeldet⁽¹⁾. Die Prävalenz einer Giardiasis liegt in Industrieländern zwischen 2 und 7 %, während sie in Entwicklungsländern bei 20 bis 30 % liegt⁽²⁾. Die Infektion erfolgt durch die Aufnahme von Zysten aus kontaminiertem Wasser, Lebensmitteln oder über den fäkal-oralen Weg. Eine akute Giardiasis entwickelt sich nach einer Inkubationszeit von 15 bis 30 Tagen und dauert in der Regel 1 bis 3 Wochen. Symptome einer akuten Infektion sind breiiger, stinkender Durchfall, Bauchschmerzen, Blähungen, Übelkeit und Erbrechen. Es gibt durchaus aber auch chronische Verlaufsformen oder sogar asymptomatische Träger⁽³⁾.

Cryptosporidium parvum ist eine von mehreren Arten der Gattung *Cryptosporidium*. *C. parvum* und *C. hominis* zählen zu den häufigsten Verursachern einer Cryptosporidiose beim Menschen und sind verantwortlich für über eine Millionen Todesfälle pro Jahr. Aber auch Infektionen durch weitere *Cryptosporidium* spp. wie *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* und *C. muris* können zu klinischen Symptomen führen⁽⁴⁾. Im Zeitraum von 2009 bis 2017 wurden in den USA insgesamt 444 Ausbrüche von Cryptosporidiose gemeldet, mit 7465 Fällen, 287 Krankenhausaufenthalten und einem Todesfall⁽⁵⁾. Die Infektion erfolgt überwiegend durch die Aufnahme von Sporoziten enthaltenden Oozysten aus kontaminiertem Wasser, Lebensmitteln sowie über die fäkal-orale Übertragung von Mensch zu Mensch. Symptome einer Cryptosporidiose reichen von asymptomatischem Verlauf bis hin zu erheblichem wässrigen Durchfall, sowie Bauchschmerzen, Übelkeit und Fieber. Die Infektionsdosis, bei der 50% der Exponierten infiziert werden, ist gering

und liegt bei 10-1.000 Oozysten. Bei immunkompetenten Menschen halten die Symptome insgesamt etwa 1 bis 2 Wochen an. Bei Personen mit immunologischen Defiziten, wie z.B. HIV-Patienten, kann der Verlauf der Cryptosporidiose viel schwerer, länger und sogar lebensbedrohlich sein⁽⁴⁾. Der Krankheitsverlauf hängt hierbei von dem Grad der Immunschwäche ab^(6,7).

Entamoeba histolytica ist die einzige humanpathogene Spezies in der Gattung *Entamoeba* und verursacht Infektionen des Magen-Darm-Trakts, die als Amöbiasis bekannt sind. Die Infektion erfolgt fäkal-oral durch die Aufnahme von Zysten durch kontaminiertes Wasser und Lebensmittel, aber auch von Mensch zu Mensch^(8, 9). Jährlich treten etwa 50 Millionen Infektionen auf, die zu 40.000 bis 110.000 Todesfällen führen⁽⁸⁾. Etwa 90 % der Infektionen verlaufen asymptomatisch. Bei symptomatischem Verlauf können sich Symptome innerhalb von 2 bis 4 Wochen entwickeln, wobei Durchfall, Bauchschmerzen und Fieber bis hin zu schweren Erkrankungen wie Amöbenwucherungen (Amöbome), die als eine im Dickdarm gebildete Masse definiert sind, inbegriffen sind⁽⁹⁾.

3. Testprinzip

Der RIDA[®]UNITY Parasitic Stool Panel II ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung *Giardia lamblia*-, *Cryptosporidium* spp.- und *Entamoeba histolytica*-DNA aus humanen Stuhlproben. Die Abarbeitung erfolgt ausschließlich automatisiert mit dem RIDA[®]UNITY System. Zunächst erfolgt die Extraktion der Nukleinsäuren mithilfe des RIDA[®]UNITY Universal Extraction Kit und unter Verwendung des Internal Control Kits. Der Nachweis der Targetsequenz erfolgt immer im One-Step real-time RT-PCR Format (auch bei DNA Assays), d.h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA (falls vorhanden) wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die spezifischen Genfragmente für *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. und *Entamoeba histolytica* (ITS1-18S) werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen 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. Um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können, ist eine parallele Anwendung des RIDA[®]UNITY Internal Control Kit nötig.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 96 Bestimmungen*.

Tab. 1: Packungsinhalt

REF	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
UNZ1725RM	Reaction Mix	1 x	1935 µl	gelb, gebrauchsfertig
UNZ1725EM	Enzyme Mix	1 x	350 µl	rot, gebrauchsfertig
UNZ1725PC	Positive Control	1 x	200 µl	blau, gebrauchsfertig
UNZ1725NC	Negative Control	1 x	450 µl	weiß, gebrauchsfertig

* bei mehrfacher Verwendung und kleineren Serien kann sich die Anzahl der Reaktionen verringern.

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -16 °C bis -28 °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 8 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaften nicht.

Tab. 2: Lagerungsbedingungen und -hinweise

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-16 °C bis -28 °C	Bis zum aufgedrucktem Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-16 °C bis -28 °C	8 Tau-/Frier-Zyklen

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time RT-PCR Test ist ausschließlich für die Verwendung mit dem RIDA®UNITY System geeignet. Für eine korrekte Anwendung sind folgende Produkte zwingend erforderlich:

6.1 Reagenzien

Folgende Reagenzien werden für die Anwendung des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Tests benötigt:

Reagenzien	Artikelnummer
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Anwendung des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Tests benötigt:

Zubehör
RIDA®UNITY System; Artikelnummer: ZUNITY (R-Biopharm AG)
RIDA®UNITY-Verbrauchsmaterialien (Spitzen, Platten, Reaktionsgefäße, Folien) - Siehe hierzu Bedienungsanleitung RIDA®UNITY System Bestellinformationen Verbrauchsmaterial
Vortexer
Tischzentrifuge
Puderfreie Einmalhandschuhe
Externer Cycler (mögliche Systemerweiterung)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Das RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Kit kann in Verbindung mit anderen kompatiblen Cyclern verwendet werden. Alternative real-time PCR-Geräte müssen durch den Anwender verifiziert/validiert werden. Kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG zur Überprüfung der Kompatibilität unter pcr@r-biopharm.de.

7. Vorsichtsmaßnahmen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem 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. Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase / RNase).

Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.

Das Austauschen und Vermischen der Komponenten (Reaction Mix, Enzyme-Mix, Positive Control, Negative Control) einer Kit-Charge mit den Komponenten einer anderen Charge ist untersagt.

Das Testkit kann nach erstmaliger Öffnung bis zu 8 Wochen lang verwendet werden (ein erneutes Laden bis zu 6 mal ist hierbei möglich). Nach Erreichen des Verfallsdatums sollte das Testkit nicht mehr verwendet werden. Diese Vorgaben werden ebenfalls durch das RIDA®UNITY System überprüft.

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 zum Safety Data Sheet (SDS) finden Sie unter der Artikelnummer auf <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Für Anwender in der Europäischen Union: Im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegenden Vorfälle sind der R-Biopharm AG und der zuständigen nationalen Behörde zu melden.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Für die bestmögliche Performance des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Assay wird die Verwendung von frischem Probenmaterial empfohlen.

Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden.

Stuhlproben sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit den RIDA®UNITY Tests auftreten können.

Es wird empfohlen, Aliquots der Proben herzustellen, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Gefrorene Proben sollten direkt vor der Extraktion aufgetaut werden, um eine Degradation der Nukleinsäuren zu verhindern.

Bitte folgen Sie den Probenlagerungsvorgaben in Tabelle 3 bis 5.

Tab. 3: Probenlagerung - Nachweis *Giardia lamblia*

Native Proben - Stuhl		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 Tage	≤ 7 Tage	≤ 6 Monate

Im Eluat		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 Stunden	≤ 36 Stunden	≤ 7 Tage

Bei einer Lagerung von -20 °C / - 80 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen der Proben bis zu 5 Mal die Testeigenschaft nicht.

Bei einer Lagerung von -20 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen des Eluats bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht.

Tab. 4: Probenlagerung - Nachweis *Entamoeba histolytica*

Native Proben - Stuhl			
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C	-80 °C
-	≤ 7 Tage	≤ 3 Monate	≤ 6 Monate

Im Eluat		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 Stunden	≤ 36 Stunden	≤ 7 Tage

Bei einer Lagerung von -80 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen der Probe bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht. Für diesen Analyten sollte ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben bei -20 °C vermieden werden. Bei einer Lagerung von -20 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen des Eluats bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht.

Tab. 5: Probenlagerung - Nachweis *Cryptosporidium* spp.

Native Proben - Stuhl			
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C	-80 °C
< 1 Tag	≤ 7 Tage	≤ 3 Monate	≤ 6 Monate

Im Eluat		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 Stunden	≤ 36 Stunden	≤ 7 Tage

Der Analyt *Cryptosporidium* spp. ist nach wiederholtem Einfrieren/Auftauen der Stuhlprobe für fünf Tau-/Frierzyklen bei -80 °C und für drei Tau-/Frierzyklen bei -20 °C stabil.

Bei einer Lagerung von -20 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen des Eluats bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht.

8.1 DNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Isolierung aus Stuhlproben kommt das RIDA®UNITY Universal Extraction Kit zur Anwendung. Die korrekte Durchführung in der Gebrauchsanweisung des RIDA®UNITY Universal Extraction Kit ist zu beachten (Kapitel: Nukleinsäure-Präparation aus Stuhlproben; Kapitel: Nukleinsäure-Präparation aus Kulturproben).

9. Testdurchführung

Sowohl die Proben als auch die Reagenzien des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II werden zu Beginn der Anwendung bereits auf dem RIDA®UNITY System platziert. Vorab sollten **Reaction Mix**, **Negative Control** und **Positive Control** mittels eines Vortexers ausreichend gemischt werden. Den **Enzyme Mix** nicht vortexen! Im Anschluss sind alle Komponenten kurz zu zentrifugieren.

Die PCR-Tubes für die zu untersuchenden Proben müssen in dem integrierten PCR-Cycler vorab positioniert werden.

Für die korrekte Beladung des Systems mit Reagenzien und Verbrauchsmaterial stehen entsprechende Carrier zu Verfügung. Die Beladung erfolgt nach Angabe des RIDA®UNITY Systems. Entsprechende Abschnitte im Handbuch des RIDA®UNITY Systems sind zu beachten (Kapitel: Durchführung eines Laufs).

Der RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Test darf nur in Kombination mit dem RIDA®UNITY Internal Control Kit angewendet werden. Dadurch kann eine mögliche PCR-Inhibition frühzeitig erkannt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt werden. Die Anwendung erfolgt entsprechend den Angaben in der Gebrauchsanweisung des RIDA®UNITY Internal Control Kits (Kapitel: Testdurchführung).

Die automatisierte Abarbeitung wird im Handbuch des RIDA®UNITY Systems beschrieben (Kapitel: Durchführung eines Laufs).

9.1 Geräteeinstellungen

9.1.1 Universal real-time PCR-Profil

Zur Harmonisierung der RIDA®UNITY Assays wird der RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Assay ausschließlich im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA- und RNA-Assays miteinander zu kombinieren. Daher ist im Universalprofil generell eine reverse Transkription vorangestellt.

Tab.6: Universal real-time PCR Profil für RIDA®UNITY

<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.7: Universal real-time PCR Profil für CFX96™ Dx

<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.

9.2 Detektionskanaleinstellung

Tab.8: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	SEEK Kanal Giardia
	Internal Control	HEX	SEEK Kanal ICD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	SEEK Kanal Enta
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	SEEK Kanal Crypto
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	SEEK Kanal Giardia
	Internal Control	VIC	SEEK Kanal ICD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	SEEK Kanal Enta
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	SEEK Kanal Crypto

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software RIDA®SEEK des RIDA®UNITY Systems. **Negative Control** und **Positive Control** müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 9.)

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.

Die **Negative Control** beinhaltet bereits die RIDA®UNITY Internal Control. Da sie kein Template enthält, sind in den Target-Kanälen keine Signale zu erwarten. Positive Signale im IC-Kanal, mit dem die Internal Control detektiert wird, sind zwingend notwendig (s. Tab 9).

Tab.9: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	IC Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	+	N/A*	Siehe Certificate of Analysis
Negativkontrolle	-	Ct > 20	0

*Der IC Kanal kann in der Positivkontrolle unter Umständen ein positives Signal zeigen und ist daher nicht zu bewerten.

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

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen in der PCR 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

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor.

11. Auswertung und Interpretation

Die Auswertung und Interpretation der Proben erfolgt über die Analyse-Software des RIDA®UNITY Systems, der RIDA®SEEK.

Derzeit gibt es weder eine international anerkannte Referenzmethode noch ein Referenzmaterial für die Standardisierung. Die Kontrollmaterialien sind auf die R-Biopharm AG internen Standards, basierend aus spezifischen DNA-Amplifikaten, metrologisch rückführbar.

Für weitere Informationen zur metrologischen Rückführbarkeit kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG.

Entnehmen Sie bitte die eingestellten Werte und Schwankungen sowie weitere Details dem Analysezertifikat (Certificate of Analysis, CoA).

Tab.10: Interpretation der Ergebnisse*

Nachweis von			ICD	Ergebnis
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium spp.</i>		
+	-	-	+/-	<i>Giardia lamblia</i> nachweisbar
-	+	-	+/-	<i>Entamoeba histolytica</i> nachweisbar
-	-	+	+/-	<i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
+	+	-	+/-	<i>Giardia lamblia, Entamoeba histolytica</i> nachweisbar
+	-	+	+/-	<i>Giardia lamblia, Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
-	+	+	+/-	<i>Entamoeba histolytica, Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
+	+	+	+/-	<i>Giardia lamblia, Entamoeba histolytica</i> und <i>Cryptosporidium spp.</i> nachweisbar
-	-	-	+	Zielgene nicht nachweisbar
-	-	-	-	Ungültig

* += positiv

- = negativ

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

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die Internal Control jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der Internal Control ist in diesem Fall nicht notwendig, da

hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der **Internal Control** führen können.

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

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control** keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf.

12. Grenzen der Methode

1. Der RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Test weist *Giardia lamblia*-, *Cryptosporidium* spp.- und *Entamoeba histolytica*- DNA. aus unbehandelten humanen Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Ct-Werts und dem Auftreten schwerer klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
2. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
3. Dieser Test ist nur zur automatischen Abarbeitung mit dem RIDA®UNITY System zugelassen.
4. Dieser Test wird nur für Stuhlproben verifiziert.
5. Bei Einsatz der Matrix Kultur eine Überführung des Agar-Mediums in die PCR Reaktion vermeiden, da dies zu möglichen Interferenzen führen kann.
6. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
7. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
8. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter der Nachweisgrenze (LoD 95 %) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
9. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
10. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die spezifischen Genfragmente für *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. und *Entamoeba histolytica* (ITS1-18S) vorhanden sind.
11. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Gute Laborpraxis) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Klinische Leistungsmerkmale

Die RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR wurde in einem externen Labor mit einem CE-markierten Referenztest anhand von 278 Stuhlproben, von Patienten mit Symptomen einer gastrointestinalen Infektion, verglichen.

Die Ergebnisse zeigen eine hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* und *Cryptosporidium spp.* unter Verwendung des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Kits.

Tab. 11: Nachweis von *Giardia lamblia*

		Referenz PCR		Gesamt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II- <i>Giardia lamblia</i>	Positiv	77	1	78
	Negativ	8	192	200
	Gesamt	85	193	278

Relative Sensitivität (95 % KI)	90,6 % (82,3 % - 95,8 %)
Relative Spezifität (95 % KI)	99,5 % (97,1 % - 100 %)

Tab. 12: Nachweis von *Entamoeba histolytica*

		Referenz PCR		Gesamt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II- <i>Entamoeba histolytica</i>	Positiv	70	1	71
	Negativ	7	200	207
	Gesamt	77	201	278

Relative Sensitivität (95 % KI)	90,9 % (82,2 % - 96,3 %)
Relative Spezifität (95 % KI)	99,5 % (97,3 % - 100 %)

Tab. 13: Nachweis von *Cryptosporidium spp.*

		Referenz PCR		Gesamt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II- <i>Cryptosporidium spp.</i>	Positiv	74	1	75
	Negativ	1	202	203
	Gesamt	75	203	278

Relative Sensitivität (95 % KI)	98,7 % (92,8 % - 100 %)
Relative Spezifität (95 % KI)	99,5 % (97,3 % - 100 %)

13.2 Analytische Leistungsmerkmale

13.2.1 Nachweisgrenze (LoD 95 %)

Zur Ermittlung des LoDs („Limit of detection“) wurde pro Target jeweils eine positive Kontrollprobe (negative Stuhlproben, gespiked oder mittels Kulturprobe) in fünf Verdünnungsstufen (in 0,25 log-Stufen) mit 20 Replikaten pro Stufe mit einer Lot gemessen. Darauffolgend wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Anschließend wurde die Bestätigung des berechneten LoD mit 20 Replikaten pro Target an der berechneten Verdünnungsstufe / Konzentration durchgeführt.

Für die Testung wurden folgende Stämme verwendet:

- *Cryptosporidium* spp. aus gepoolten positiven klinischen Stuhlproben (MF171865 und MF172060); Ausgangskonzentration nicht bekannt; Ct-Bereich 24-25
- *Giardia lamblia* aus gepoolten positiven klinischen Stuhlproben (34544905 und 34504696); Ausgangskonzentration nicht bekannt; Ct-Bereich 29-30
- *Entamoeba histolytica* CF (ATCC® 30015™); Ausgangskonzentration 2,7 x 10⁶ Zellen/mL

Für den Nachweis von *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica* DNA mithilfe des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Assays auf dem UNITY System konnten folgende Nachweisgrenzen bestimmt werden.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tab. 14: Ergebnisse der Nachweisgrenze des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Tests für die Parameter *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica*.

	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
LoD	1,68E-2 Verdünnungsfaktor** (Ct-Bereich 35,34 ± 0,72)	9,53 Zellen/ml	1,98E-2 Verdünnungsfaktor* (Ct-Bereich 36,18 ± 2,05)

* Relative Verdünnung der Stammkonzentration. Klinische positive Probe mit Ausgangskonzentration Ct: 24-25

** Relative Verdünnung der Stammkonzentration. Klinische positive Probe mit Ausgangskonzentration Ct: 29-30

Der LoD für *Giardia lamblia* in Stuhlproben wurde bei 1,68E-2 Verdünnungsfaktor bestimmt.

Der LoD für *Entamoeba histolytica* in Stuhlproben wurde bei 9,53 Zellen/ml bestimmt.

Der LoD für *Cryptosporidium* spp in Stuhlproben wurde bei 1,98E-2 Verdünnungsfaktor bestimmt.

Für den erweiterten Workflow mit dem CFX96™ Dx konnten diese LoD Werte bestätigt werden unter der Voraussetzung, dass wir in einem 2-3-fachen LoD Bereich verbleiben.

13.2.2 Analytische Spezifität

Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen, die aufgrund verbreiteter Anwendung bei gastrointestinalen Infektionen oder verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben vorliegen könnten, untersucht.

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden zunächst mit hohen Konzentrationen (dreifache Tagesdosis oder Simulation des „worst case“) in einem Interferenz-Screen untersucht.

Für die in Tabelle 15 aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt.

Tab. 15: Potentiell interferierende Substanzen

Potentiell interferierende Substanz	Konzentration
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg Filmtabletten (Azithromycin)	0,75 % [w/v]
Cologran® Flüssigsüßstoff (Saccharin + Cyclamat)	1,3 % [w/v]
Humanblut	5 % [v/v]
Kohle-Tabletten 250mg (Kohle)	6 % [w/v]
Mucine	5 % [w/v]
Stearin- / Palmitinsäure	40 % [w/v]

Kreuzreaktivität

Verschiedene Organismen (Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren), die häufig in der Matrix Stuhl vorkommen können, wurden untersucht. Die Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen für diesen Assay beruhte entweder darauf, dass diese natürlicherweise in Stuhlproben zu finden sind oder als gastrointestinale Erreger entsprechende Symptome hervorrufen. Für Analysen wurden Bakterien- (zwischen 10^6 und 10^9 CFU/ml), Pilz- oder Viruskulturen, Überstände von Viruskulturen, Isolate sowie LGC-Standards der jeweiligen Organismen verwendet.

Die RIDA[®]UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica*. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 16):

Tab. 16: Potentiell kreuzreaktive Organismen.

Organismus	Testergebnis*		
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	-	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	-	-
Astrovirus	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-
Coxsackievirus B4	-	-	-

<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
Echovirus Type 11	-	-	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
Enterovirus Type 71	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GGI	-	-	-
Norovirus GGII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-

* - = negativ

13.2.3 Präzision

Die Präzision des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II real-time PCR Tests wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

Intra-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem RIDA®UNITY unter identischen Bedingungen.

Inter-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben in 20 Läufen in Duplikaten an 10 Arbeitstagen (2 Läufe pro Tag) von unterschiedlichen Operatoren unter reproduzierbaren Bedingungen.

Die Testungen zur *Intra-* und *Inter-Assay* Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die erhaltenen Variationskoeffizienten der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II real-time PCR Test auf dem RIDA®UNITY und dem CFX96™ Dx lagen bei 5,06 %.

Tab. 17: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Tests für *Giardia lamblia*.aus Stuhlproben (RIDA®UNITY System).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	-	-	-	-	-	-	
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
2	Ct	34,3	34,5	34,0	35,0	34,8	35,2	35,0
	VK (%)	2,40 %	1,73 %	1,60 %	2,38 %	2,22 %	2,23 %	2,31 %
3	Ct	34,9	35,2	34,2	35,5	35,2	35,3	35,3
	VK (%)	2,14 %	1,88 %	2,28 %	3,05 %	2,29 %	2,50 %	2,63 %
4	Ct	33,1	33,4	33,2	33,0	33,0	33,0	33,0
	VK (%)	1,67 %	1,60 %	1,45 %	1,96 %	1,93 %	2,01 %	1,97 %
5	Ct	33,3	33,7	33,6	33,8	33,6	33,6	33,0
	VK (%)	1,73 %	1,74 %	1,46 %	1,82 %	1,91 %	1,81 %	1,97 %

Tab. 18: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Tests für *Giardia lamblia* aus Stuhlproben (CFX96™ Dx).

Ct- Mittelwert / VK	Intra-Assay			Inter-Assay			Inter- Lot	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	-	-	-	-	-	-	
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
2	Ct	35,0	35,5	34,9	35,3	35,1	35,2	
	VK (%)	2,76 %	1,86 %	2,51 %	1,97 %	2,26 %	2,27 %	2,22 %
3	Ct	35,8	35,8	35,3	35,5	35,3	35,2	35,3
	VK (%)	2,83 %	2,52 %	2,32 %	2,56 %	2,41 %	2,57 %	2,47 %
4	Ct	33,2	33,2	33,3	32,9	32,9	32,8	32,9
	VK (%)	2,08 %	2,18 %	2,16 %	2,10 %	1,54 %	1,64 %	1,78 %
5	Ct	34,1	34,7	33,7	33,7	33,6	33,6	33,6
	VK (%)	1,81 %	1,88 %	2,39 %	1,77 %	1,90 %	1,79 %	1,82 %

Tab. 19: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Tests für *Entamoeba histolytica* aus Stuhlproben (RIDA®UNITY System).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter-Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	-	-	-	-	-	-	
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
2	Ct	31,9	32,2	32,1	34,5	34,3	34,5	34,4
	VK (%)	5,46 %	1,30 %	1,29 %	3,33 %	2,86 %	3,68 %	3,31 %
3	Ct	31,5	31,9	30,4	33,6	33,5	33,6	33,6
	VK (%)	2,14 %	1,89 %	3,16 %	2,81 %	3,24 %	3,53 %	3,21 %
4	Ct	29,7	30,4	30,0	30,7	30,7	30,8	30,7
	VK (%)	0,85 %	0,87 %	1,34 %	1,94 %	1,69 %	2,02 %	1,89 %
5	Ct	31,3	32,8	32,6	31,9	31,8	31,9	31,9
	VK (%)	3,21 %	4,73 %	2,47 %	2,60 %	2,23 %	2,71 %	2,52 %

Tab. 20: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Tests für *Entamoeba histolytica* aus Stuhlproben (CFX96™ Dx).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter-Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	-	-	-	-	-	-	
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
2	Ct	32,4	32,8	32,2	33,9	33,8	33,7	33,8
	VK (%)	2,12 %	2,21 %	2,12 %	2,63 %	3,02 %	3,00 %	2,89 %
3	Ct	31,7	31,7	31,3	33,0	32,9	32,7	32,9
	VK (%)	2,02 %	1,71 %	1,95 %	3,16 %	2,55 %	2,71 %	2,82 %
4	Ct	30,0	29,6	29,5	30,4	30,5	30,4	30,5
	VK (%)	0,60 %	0,76 %	0,72 %	1,98 %	1,63 %	1,79 %	1,81 %
5	Ct	32,6	33,3	32,0	31,3	31,4	31,3	31,3
	VK (%)	2,09 %	3,68 %	2,23 %	2,01 %	1,78 %	1,58 %	1,80 %

Tab. 21: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Tests für *Cryptosporidium* spp. aus Stuhlproben (RIDA®UNITY System).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	-	-	-	-	-	-	
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
2	Ct	31,5	32,9	33,3	32,0	34,7	34,3	33,7
	VK (%)	2,25 %	1,61 %	1,41 %	1,83 %	3,15 %	2,74 %	5,06 %
3	Ct	33,8	35,0	34,4	32,8	35,4	35,0	34,4
	VK (%)	2,92 %	2,31 %	1,95 %	2,42 %	3,27 %	3,40 %	5,03 %
4	Ct	27,3	28,1	28,3	26,6	28,8	28,6	28,0
	VK (%)	0,70 %	1,15 %	0,90 %	1,41 %	2,86 %	2,60 %	4,94 %
5	Ct	28,5	29,7	29,5	27,2	29,4	29,3	28,6
	VK (%)	0,70 %	1,04 %	0,94 %	1,57 %	2,82 %	2,47 %	4,84 %

Tab. 22: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II Tests für *Cryptosporidium* spp. aus Stuhlproben (CFX96™ Dx).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter-Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	-	-	-	-	-	-	
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
2	Ct	30,5	32,3	31,8	32,4	34,2	34,3	33,6
	VK (%)	1,81 %	2,07 %	1,23 %	2,93 %	2,97 %	2,58 %	4,16 %
3	Ct	31,8	32,9	34,6	33,5	34,6	34,7	34,3
	VK (%)	3,68 %	1,53 %	1,84 %	3,38 %	2,90 %	2,75 %	3,55 %
4	Ct	27,0	28,1	28,2	27,2	28,6	28,6	28,1
	VK (%)	0,78 %	1,02 %	0,93 %	2,20 %	2,87 %	2,21 %	3,74 %
5	Ct	28,3	29,4	29,4	27,7	29,1	29,0	28,6
	VK (%)	0,83 %	0,72 %	0,91 %	1,64 %	2,75 %	1,91 %	3,59 %

13.2.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR Tests wurde an einem definierten Panel an Parasiten untersucht (s. Tab. 23).

Tab. 23: Analytische Reaktivitätstestung

Stamm	Ergebnis*		
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Giardia lamblia</i> **	+	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** Portland 1	+	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** WB Clone C6	+	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	+	-
<i>Cryptosporidium parvum</i> (isolate)	-	-	+
<i>Cryptosporidium parvum</i> (artifizielle DNA)	-	-	+
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	+
<i>Cryptosporidium hominis</i>	-	-	+

* + = positiv (mindestens 2 von 3 Replikaten positiv)

- = negativ










** *Giardia intestinalis* und *Giardia lamblia* entsprechen demselben Organismus.

14. Versionsübersicht





Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-09-13	Freigabeversion

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

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

Testspezifische Symbole

	Reaktions-Mix
	Enzyme-Mix
	Negativkontrolle
	Positivkontrolle

16. Literatur

1. Escobedo AA, Hanevik K, Almirall P, Cimerman S, Alfonso M. Management of chronic *Giardia* infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(9):1143-57.
2. Dixon B. *Giardia duodenalis* in humans and animals – Transmission and disease. 2020.
3. Bialek R, Dostal G. Parasitosen, Mykosen, Tropen- und Reisemedizin. *Pädiatrie.* 2019:371–99. German. doi: 10.1007/978-3-662-57295-5_16. PMID: PMC7498386.
4. Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Trop.* 2018;184:1-14.
5. Dong S, Yang Y, Wang Y, Yang D, Yang Y, Shi Y, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitol.* 2020;65(4):882-9.
6. T. Löscher und G.D. Burchard (Hrsg.): *Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin.* 4. Aufl., Thieme, Stuttgart; New York, 2010, S. 655-659.
7. Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie (Hrsg.): *DGPI Handbuch. Infektionen bei Kindern und Jugendlichen.* 6. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, 2013
8. Salami A, Fakh H, Chakkour M, Salloum L, Bahmad HF, Ghsein G. Prevalence, risk factors and seasonal variations of different Enteropathogens in Lebanese hospitalized children with acute gastroenteritis. *BMC Pediatr.* 2019;19(1):137.
9. Custodio H. Protozoan Parasites. *Pediatr Rev.* 2016;37(2):59-69; quiz 70-1.