


RIDA[®] GENE Parasitic Stool Panel
real-time PCR

Art. Nr.: PG1705
100 Reaktionen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

 -20 °C



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

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Verwendungszweck

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

2. Erläuterung

Giardia lamblia, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* und *Dientamoeba fragilis* 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*, die häufig Cryptosporidiose beim Menschen verursacht. 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%.^{3,4} Bei einem Ausbruch in Milwaukee (USA) im Jahr 1993 erkrankten mehr als 400.000 Menschen.⁵ Jedes Jahr treten in den USA schätzungsweise 748.000 Fälle von Cryptosporidiose auf.⁶ 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, Unterleibschmerzen

und Gewichtsverlust begleitet werden. Bei immunsupprimierten Menschen tritt oftmals ein schwerer Krankheitsverlauf auf, der mit einer lebensbedrohlichen chronischen Diarrhoe verbunden ist.^{2,5}

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 (Amöbenleberabzess). 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.^{2,7}

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 sein. 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*.^{8,9}

Klassisch erfolgt die Diagnose von *G. lamblia*, *C. parvum*, *Entamoeba* und *D. fragilis* durch mikroskopische Untersuchung von Stuhlproben, wofür erfahrenes Personal zur Verfügung stehen muss. Die RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel 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 vier wichtigsten Durchfall verursachenden Parasiten (*G. lamblia*, *C. parvum*, *E. histolytica* und *D. fragilis*) erwiesen.

3. Testprinzip

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

Die amplifizierten Zielsequenzen von *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* und *Entamoeba histolytica* 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 Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können. Die amplifizierte Zielsequenz von *Dientamoeba fragilis* wird mittels einer Schmelzpunktanalyse ausgewertet.

4. Packungsinhalt

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

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x 1100 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x 11 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x 1800 µl	orange
N	PCR Water	1x 500 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 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 5 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 Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit für Stuhlproben (z.B. RTP[®] Pathogen Kit, STRATEC Molecular) oder
DNA-Extraktionssysteme für Stuhlproben (z.B. Maxwell[®] 16 (Promega), NucliSENS easy[®]MAG[™] (bioMérieux))

- Real-time PCR-Gerät:

Roche:	LightCycler [®] 480II
Cepheid:	SmartCycler [®]
Applied Biosystems:	ABI 7500
Abbott:	m2000rt
Stratagene:	Mx3000P, Mx3005P
QIAGEN:	Rotor-Gene Q

Bemerkung: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

- RIDA[®]GENE ColorCompensation Kit I (PG0001) bei Verwendung des LightCycler[®] 480II (Roche)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße, Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe

7. Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für die *in-vitro* Diagnostik.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- 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.
- **Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.**

8. Testdurchführung

8.1 Probenvorbereitung

8.1.1 DNA-Isolierung aus Stuhlproben

Für die DNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit (z.B. RTP[®] Pathogen Kit (STRATEC Molecular)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] 16 (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 3.000 rpm zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die Internal Control DNA (ICD) nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab.3).

Wird die Internal Control DNA (ICD) als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICD während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICD soll dem Proben-Lysisbuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden.

8.2 Herstellung des Master-Mix

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

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab.2, Tab.3). Vor der Benutzung den Reaction Mix, die Taq-Polymerase, die Positive Control, das PCR Water und die ICD auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab.2: 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	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

Tab.3: 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	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

8.3 Herstellung des PCR-Mix

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

Negativkontrolle: Je 5 µl PCR Water zum vorgelegten Master-Mix als Negativkontrolle pipettieren.

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

Proben: Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl Positive Control zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

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

Bemerkung: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz abzentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab.4, Tab.5, Abb.1, Abb. 2, Abb. 3, Abb.4, Abb.5).

8.4 Geräteeinstellungen

Tab.4: Real-time PCR Profil für LightCycler® 480II, SmartCycler®, Rotor-Gene Q

Initiale Denaturation	1 min, 95 °C
<u>Zyklen</u>	45 Zyklen
PCR Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum
Schmelzkurve	60 °C bis 95 °C continuous
Tm-Analyse: Acquisitions	1 pro °C

Bemerkung: Annealing und Extension finden im selben Schritt statt.

Tab.5: Real-time PCR Profil für Mx3000P/Mx3005P, ABI7500 und m2000rt

Initiale Denaturation	1 min, 95 °C
<u>Zyklen</u>	45 Zyklen
PCR Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum
Schmelzkurve	60 °C bis 95 °C continuous
Tm-Analyse: Acquisitions	1 pro °C

Bemerkung: Annealing und Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Bei Verwendung des Mx3000P/3005P (Agilent Technologies) muss das Schmelzkurven Profil (s. Abb. 4) getrennt nach dem real-time PCR Profil gestartet werden. Für die separate Programmierung des Schmelzkurven Profils „SYBR® Green (with Dissociation Curve)“ als Experimenten Typ und nur HEX als Detektionskanal auswählen.

Hinweis: Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die Man. Grenzwert Flour. Einheiten für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 bis 4 auf 5.0 eingestellt werden.

Abb.1: Schmelzkurven Profil LightCycler® 480II

Tm Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
60	None	00:00:05	4.4				
95	Continuous		0.14	1			

Abb.2: Schmelzkurven Profil SmartCycler®

Phase 3

Schmelzkurve ▼

Start...	Ende	Optik	Grad/Sek.
60	95	Ka 2	0.2

Abb.3: Schmelzkurven Profil Rotor-Gene Q

Click on a cycle below to modify it :

Hold (Read-Only)

Cycling (Read-Only)

Melt (Read-Only)

Hold 2 (Read-Only)

Insert after...

Insert before...

Remove

Ramp from 60 degrees to 95 degrees.

Rising by 1 degree(s) each step.

Wait for 90 seconds of pre-melt conditioning on first step.

Wait for 5 seconds for each step afterwards.

Acquire to **Melt A** on Yellow

Gain Optimisation

Optimise gain before melt on all tubes.

The gain giving the highest fluorescence less than 70 will be selected.

Abb.4: Schmelzkurven Profil Mx3000P und Mx3005P

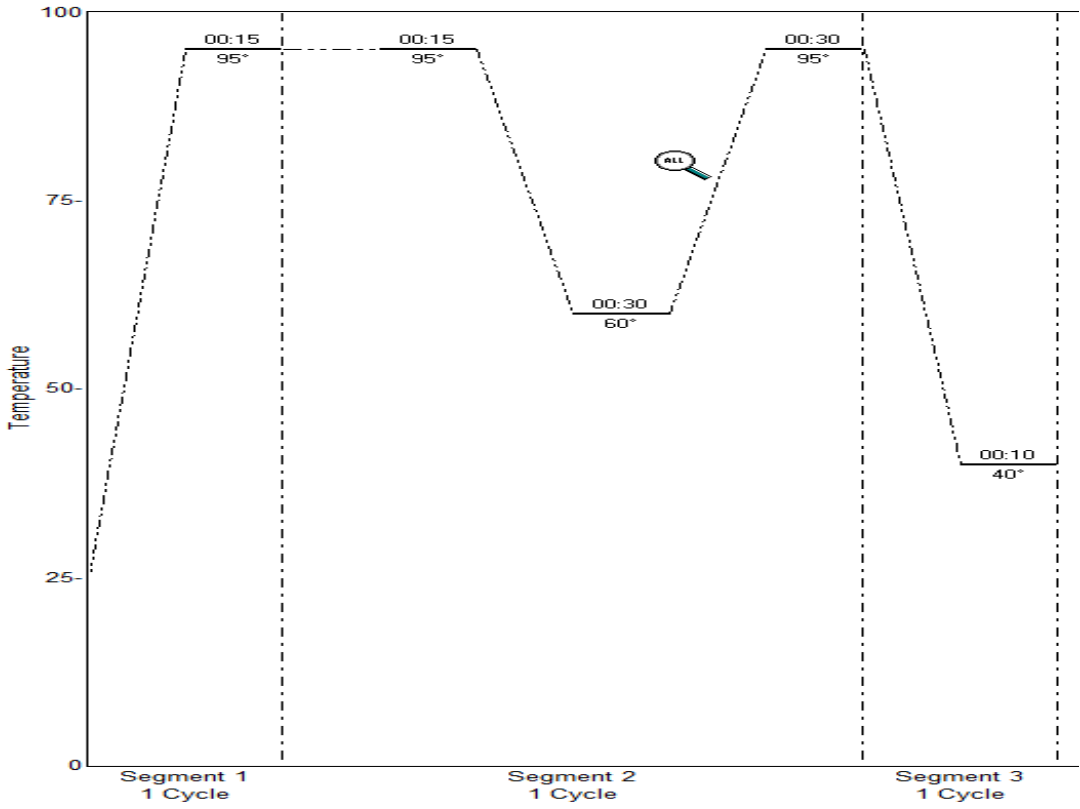
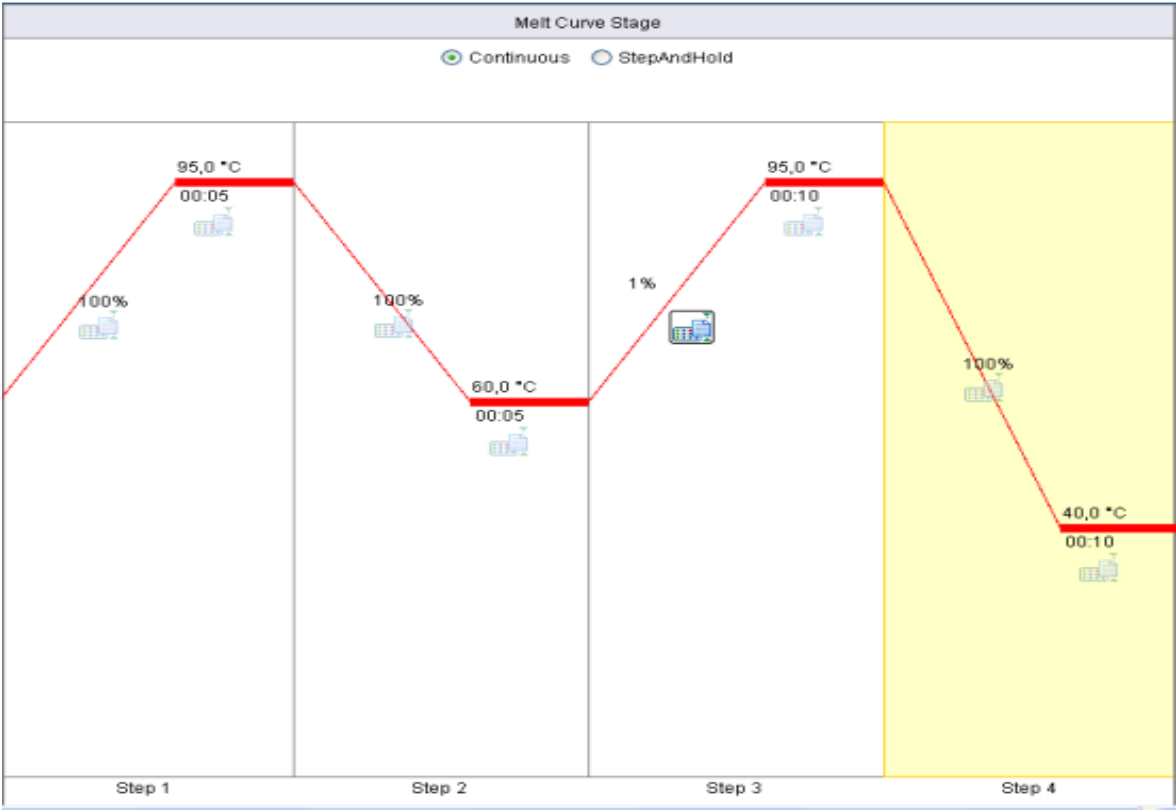


Abb.5: Schmelzkurven Profil ABI7500



8.5 Detektionskanaleinstellung

Tab.6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Dark-Quencher	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	Giardia lamblia	465/510	+	RIDA® GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICD	533/580	+	
	Entamoeba histolytica	533/610	+	
	Cryptosporidium parvum	618/660	+	
	Dientamoeba fragilis	Schmelzkurve 533/580	-	
Cepheid SmartCycler®	Giardia lamblia	Kanal 1	+	Stellen Sie die Man. Grenzwert Flour. Einheiten für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 bis 4 auf 5.0 ein
	ICD	Kanal 2	+	
	Entamoeba histolytica	Kanal 3	+	
	Cryptosporidium parvum	Kanal 4	+	
	Dientamoeba fragilis	Schmelzkurve Kanal 2	-	
ABI 7500	Giardia lamblia	FAM	none	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	none	
	Entamoeba histolytica	ROX	none	
	Cryptosporidium parvum	Cy5	none	
	Dientamoeba fragilis	Schmelzkurve VIC	-	
Abbott m2000rt	Giardia lamblia	FAM	none	-
	ICD	VIC	none	
	Entamoeba histolytica	ROX	none	
	Cryptosporidium parvum	Cy5	none	
	Dientamoeba fragilis	Schmelzkurve VIC	-	
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	Giardia lamblia	FAM	+	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	+	
	Entamoeba histolytica	ROX	+	Das Schmelzkurvenprofil muss getrennt nach dem real-time PCR Profil gestartet werden
	Cryptosporidium parvum	Cy5	+	
	Dientamoeba fragilis	Schmelzkurve HEX	-	
Qiagen Rotor-Gene Q	Giardia lamblia	Green	+	-
	ICD	Yellow	+	
	Entamoeba histolytica	Orange	+	
	Cryptosporidium parvum	Red	+	
	Dientamoeba fragilis	Schmelzkurve Yellow	-	

9. Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Abb.6, Abb.7, Abb.8, Abb.9).

Die Positivkontrolle liegt für *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica* in einer Konzentration von 10^4 Kopien / μl und für *Cryptosporidium parvum* und *Dientamoeba fragilis* in einer Konzentration von 10^3 Kopien / μl vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^4 bzw. 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Abb.6: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (*Giardia lamblia*) auf dem LightCycler® 480II

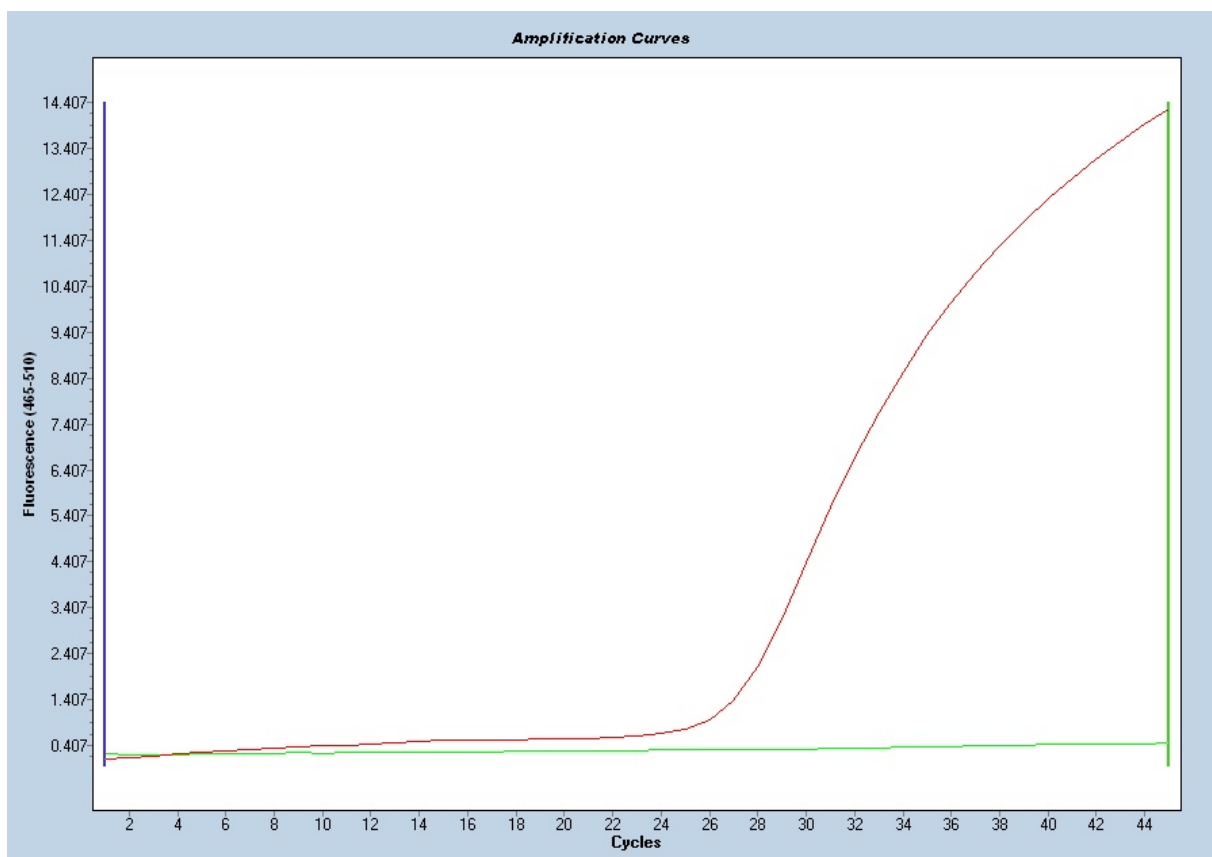


Abb.7: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Entamoeba histolytica) auf dem LightCycler® 480II

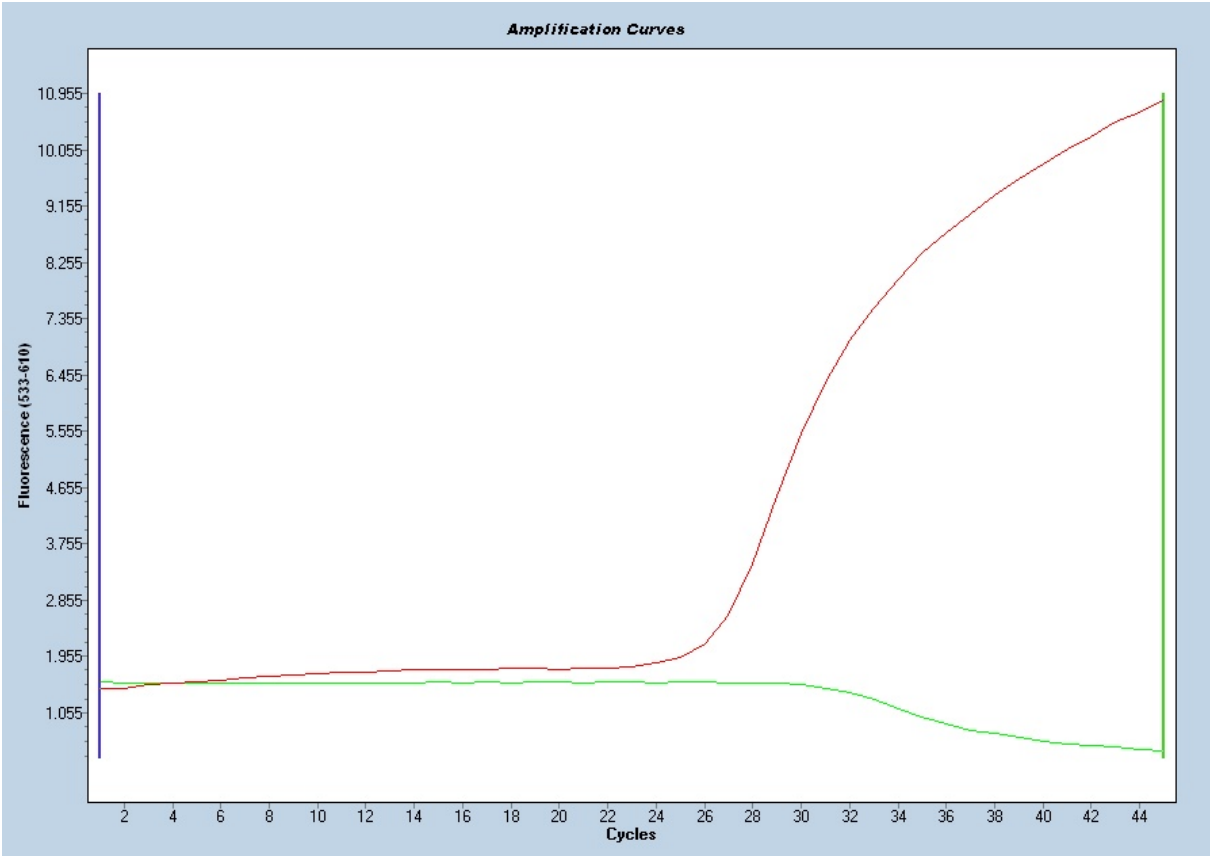


Abb.8: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (*Cryptosporidium parvum*) auf dem LightCycler® 480II

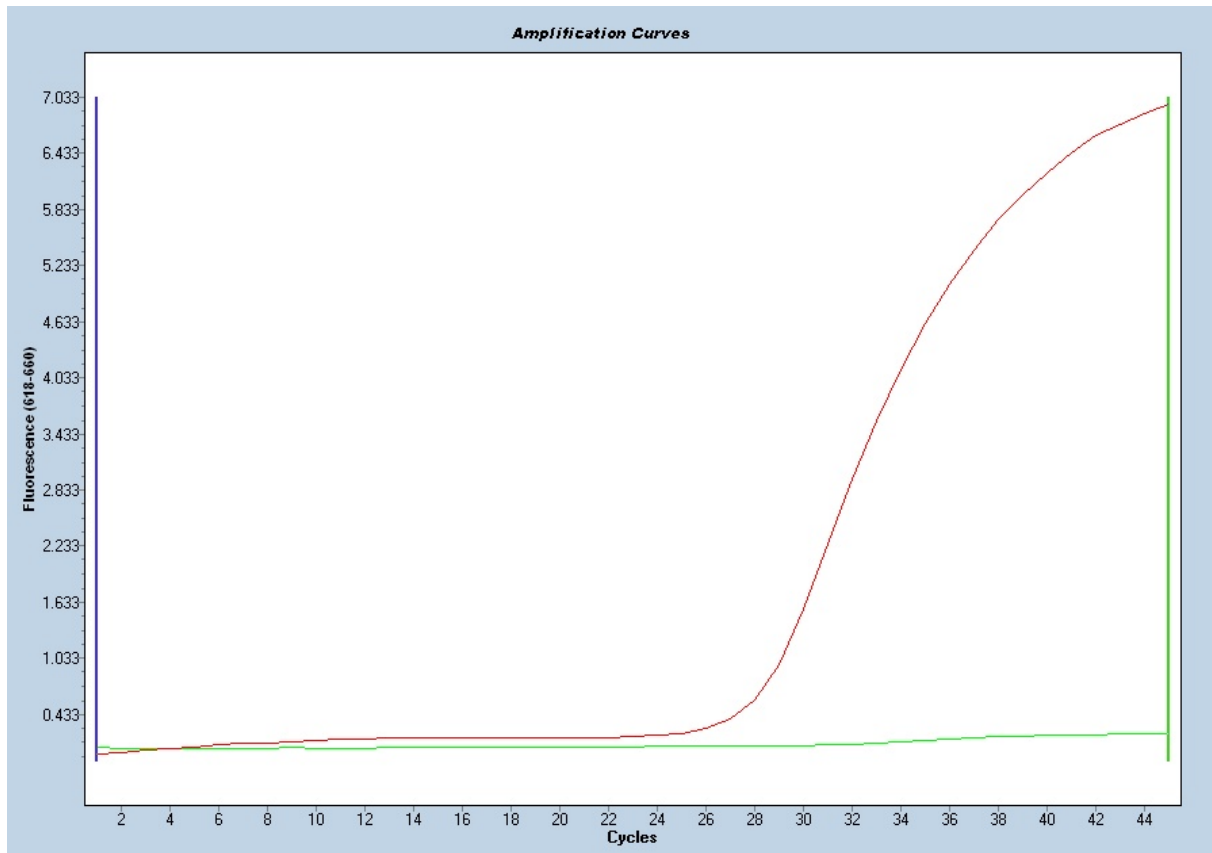
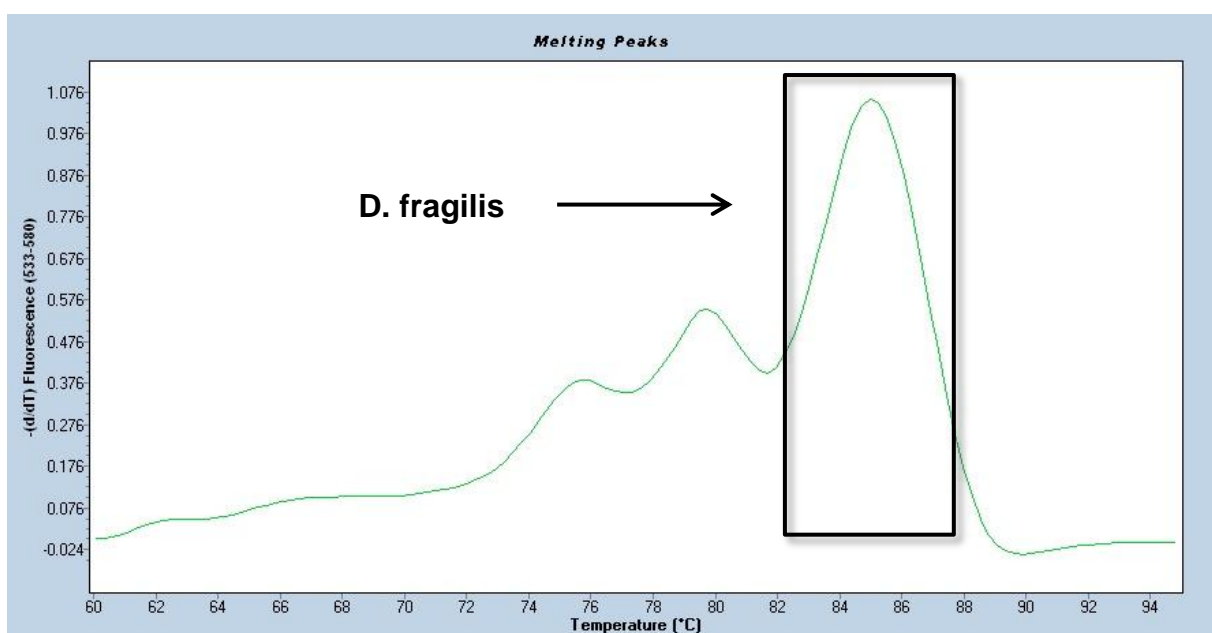


Abb.9: Korrekter Verlauf der Schmelzkurvenanalyse für *Dientamoeba fragilis* auf dem LightCycler® 480II



Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 7 und 8.

Tab.7: Interpretation der Schmelzkurvenanalyse *D. fragilis*

Real-time PCR Gerät	Schmelzkurven-temperatur <i>D. fragilis</i>
Roche LightCycler® 480II	85 °C (+/- 1 °C)
Cepheid SmartCycler®	85 °C (+/- 1 °C)
ABI 7500	83,5 °C (+/- 1 °C)
Abbott m2000rt	84 °C (+/- 1 °C)
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	85 °C (+/- 1 °C)
Qiagen Rotor-Gene Q	85,5 °C (+/- 1 °C)

Tab.8: Interpretation der Ergebnisse

	Zielgene				ICD	Ergebnis
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>C. parvum</i>	<i>D. fragilis</i>		
Detektionskanal/ Tm-Peak	positiv	negativ	negativ	-	positiv/negativ	<i>G. lamblia</i> nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	negativ	positiv	negativ	-	positiv/negativ	<i>E. histolytica</i> nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	negativ	negativ	positiv	-	positiv/negativ	<i>C. parvum</i> nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>D. fragilis</i> nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	positiv	positiv	negativ	-	positiv/negativ	<i>G. lamblia</i> und <i>E. histolytica</i> nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	positiv	negativ	positiv	-	positiv/negativ	<i>G. lamblia</i> und <i>C. parvum</i> nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>G. lamblia</i> und <i>D. fragilis</i> nachweisbar

	Zielgene				ICD	Ergebnis
	Giardia lamblia	E. histolytica	C. parvum	D. fragilis		
Detektionskanal/ Tm-Peak	negativ	positiv	positiv	-	positiv/negativ	E. histolytica und C. parvum nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	E. histolytica und D. fragilis nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	C. parvum und D. fragilis nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	positiv	positiv	positiv	-	positiv/negativ	G. lamblia, E. histolytica und C. parvum nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	G. lamblia, E. histolytica, C. parvum und D. fragilis nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	negativ	negativ	negativ	-	positiv	Zielgene sind nicht nachweisbar
Detektionskanal/ Tm-Peak	negativ	negativ	negativ	-	negativ	Ungültig

Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Cryptosporidium parvum und Dientamoeba fragilis sind nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation bzw. einen spezifischen Peak in der Schmelzkurvenanalyse (s. Tab. 7) und eine Amplifikation für die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem zeigt.

Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Cryptosporidium parvum und Dientamoeba fragilis ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation bzw. einen spezifischen Peak in der Schmelzkurvenanalyse (s. Tab. 7), jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA (ICD) ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA (ICD) führen können.

Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Cryptosporidium parvum und Dientamoeba fragilis sind nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation bzw. keinen spezifischen Peak in der Schmelzkurvenanalyse (s. Tab. 7) und die Internal Control DNA (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion bzw. ein Fehler im Extraktionsverfahren kann durch die Detektion der Internal Control DNA (ICD) ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA für Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Cryptosporidium parvum und die Internal Control DNA (ICD) keine Amplifikation bzw. keinen spezifischen Peak in der Schmelzkurvenanalyse für D. fragilis (s. Tab. 7) im Nachweissystem zeigt. 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.

10. Testmerkmale

10.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer Validierungsstudie am Bernhard-Nocht-Institut (BNI) für Tropenmedizin in Hamburg wurden insgesamt 218 DNA-Proben von symptomatischen Patienten mit der RIDA®GENE Parasitic Stool Panel real-time PCR untersucht und die Ergebnisse mit denen der in-house PCR Untersuchungen verglichen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

Tab.9: Korrelation der Giardia lamblia Ergebnisse mit der RIDA®GENE Parasitic Stool Panel real-time PCR und BNI in-house PCR

		BNI PCR		Sensitivität	95,0 %
		positiv	negativ		
RIDA®GENE Parasitic Stool Panel	positiv	38	0	Spezifität	100,0 %
	negativ	2	178	PPW	100,0 %
				NPW	98,9 %

Tab.10: Korrelation der Entamoeba histolytica Ergebnisse mit der RIDA®GENE Parasitic Stool Panel real-time PCR und BNI in-house PCR

		BNI PCR		Sensitivität	100,0 %
		positiv	negativ		
RIDA®GENE Parasitic Stool Panel	positiv	29	0	Spezifität	100,0 %
	negativ	0	189	PPW	100,0 %
				NPW	100,0 %

Tab.11: Korrelation der Cryptosporidium parvum Ergebnisse mit der RIDA®GENE Parasitic Stool Panel real-time PCR und BNI in-house PCR

		BNI PCR		Sensitivität	96,4 %
		positiv	negativ		
RIDA®GENE Parasitic Stool Panel	positiv	27	1	Spezifität	99,5 %
	negativ	1	189	PPW	96,4 %
				NPW	99,5 %

Tab.12: Korrelation der Dientamoeba fragilis Ergebnisse mit der RIDA®GENE Parasitic Stool Panel real-time PCR und BNI in-house PCR

		BNI PCR		Sensitivität	97,4 %
		positiv	negativ		
RIDA®GENE Parasitic Stool Panel	positiv	37	0	Spezifität	100,0 %
	negativ	1	57	PPW	100,0 %
				NPW	98,3 %

10.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Parasitic Stool Panel multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien / Reaktion für *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* und *Dientamoeba fragilis* (s. Abb.10, Abb.11, Abb.12, Abb.13, Abb.14).

Abb.10: Verdünnungsreihe *Giardia lamblia* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien / μl) auf dem LightCycler® 480II

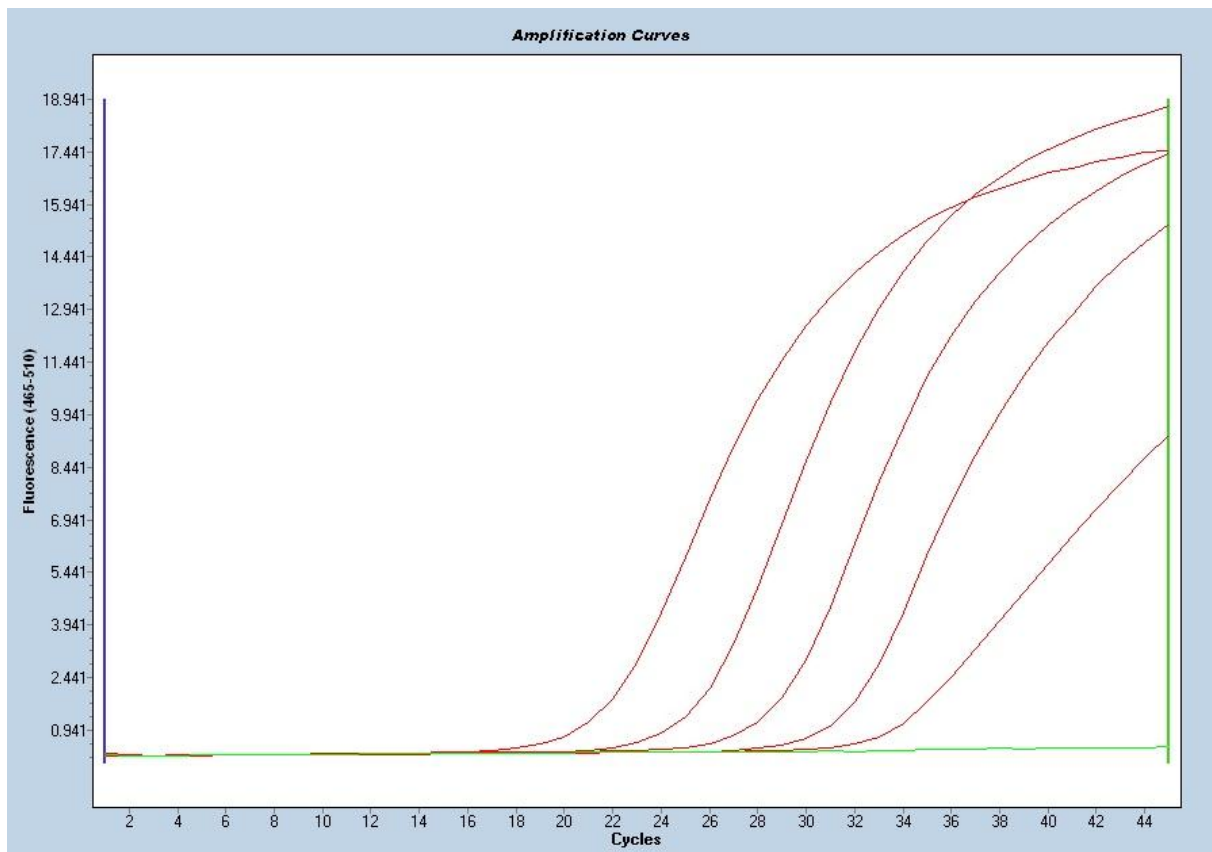


Abb.11: Verdünnungsreihe Entamoeba histolytica (10^5 - 10^1 DNA Kopien / μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

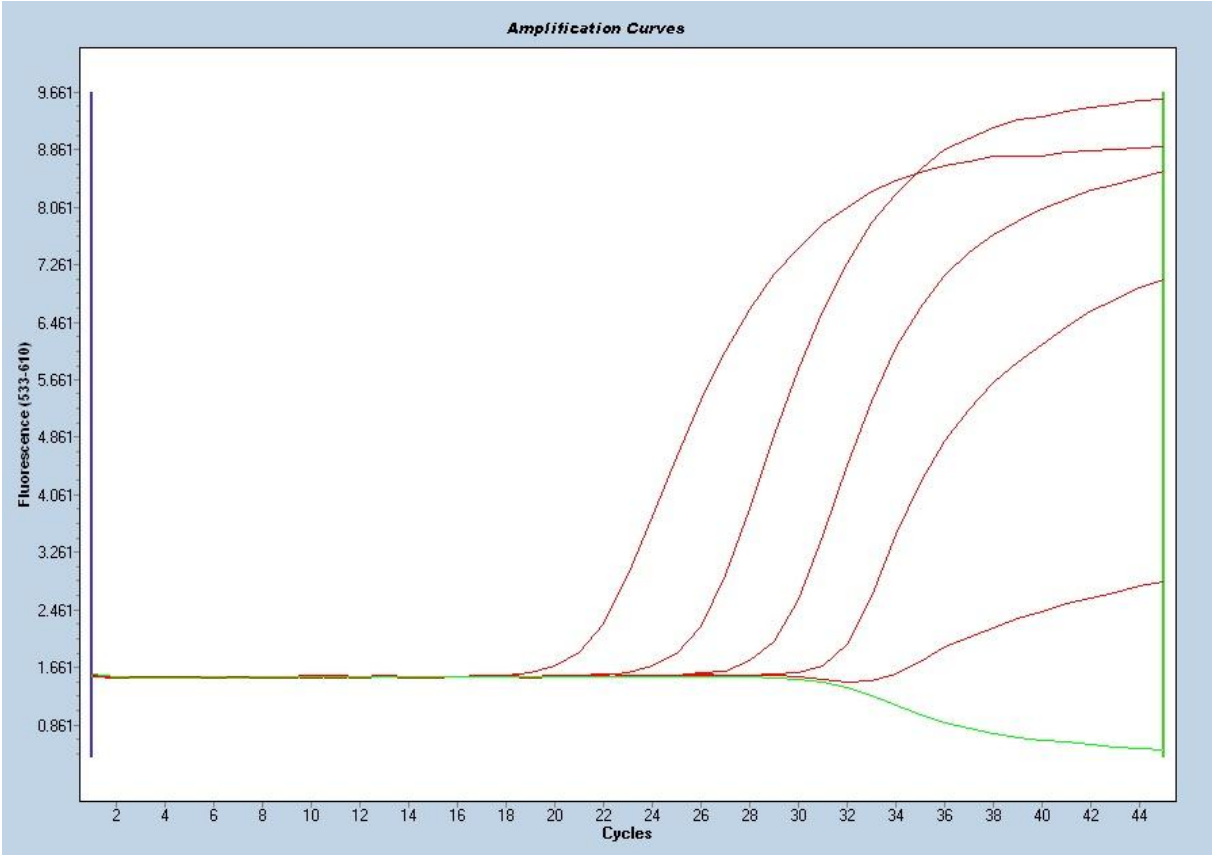


Abb.12: Verdünnungsreihe *Cryptosporidium parvum* (10^5 - 10^1 DNA Kopien / μ l) auf dem LightCycler® 480II

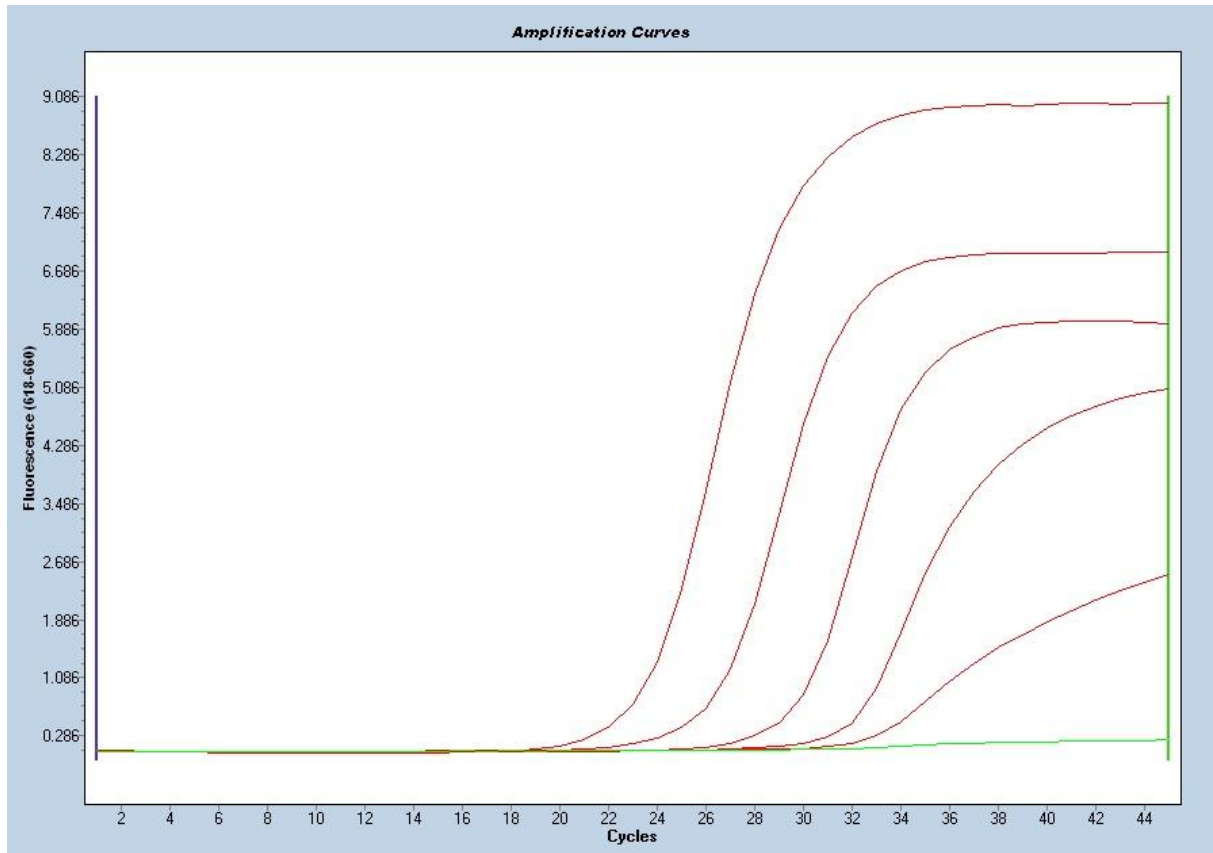


Abb.13: Verdünnungsreihe *Dientamoeba fragilis* (10^5 - 10^1 DNA Kopien / μ l) auf dem LightCycler® 480II

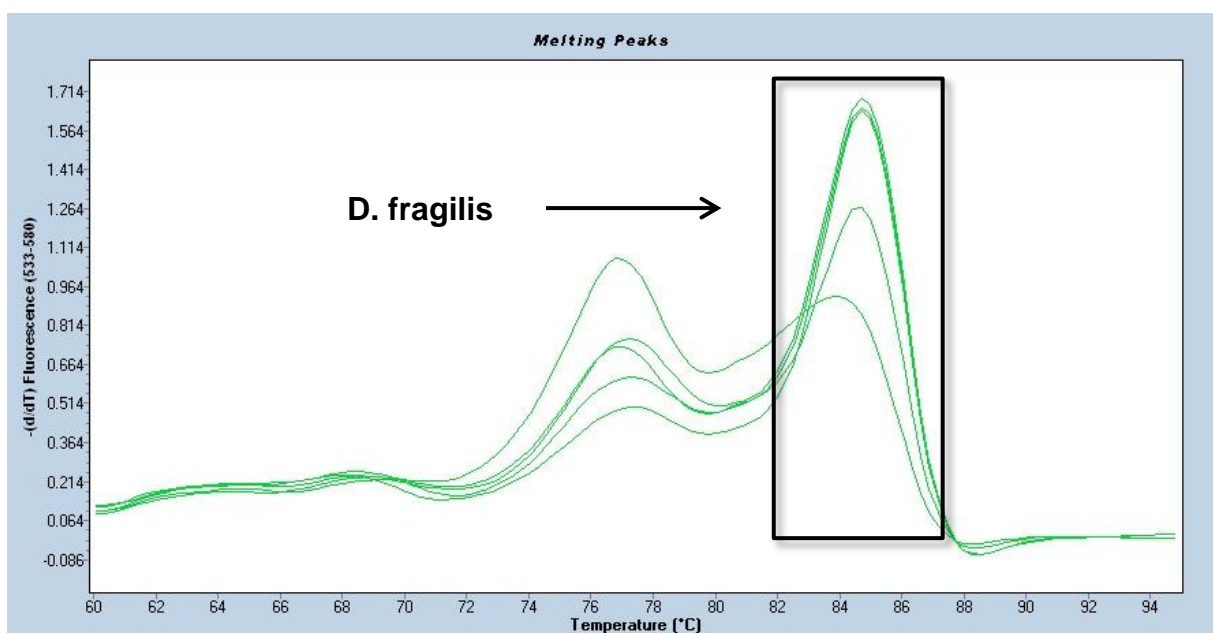
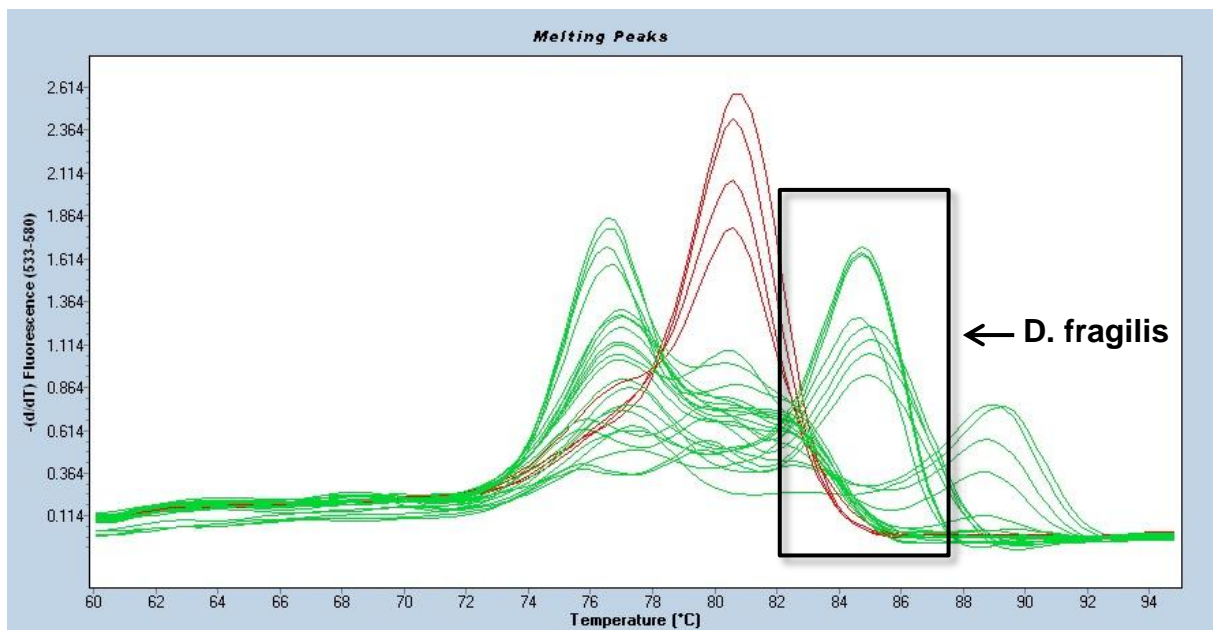


Abb.14: Exemplarische Schmelzkurvenanalyse von *Dientamoeba fragilis* auf dem LightCycler® 480II



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

10.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Parasitic Stool Panel multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* und *Dientamoeba fragilis*. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab.13):

Tab.13: Kreuzreaktivitätstestung

<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus (Typ 40, 41)	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	Enteropathogene <i>E. coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	Enterotoxische <i>E. coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Norovirus	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-		

11. Grenzen des Verfahrens

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 Viruslast 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 Sondenbindungsregion können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Parasitic Stool Panel 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 (18s-IST) vorhanden sind.

12. 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. Robert Koch Institut 2010. Kryptosporidiose (Cryptosporidium parvum). RKI-Ratgeber für Ärzte 2004. Aufgerufen am 24.07.2012.
4. LEE JK, SONG HJ und Jae-Ran YU JR. Prevalence of diarrhea caused by Cryptosporidium parvum in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea . Korean J Parasitol. 2005, 43(3):111-114.
5. Leitch GJ und Qing He. Cryptosporidiosis - an overview. J Biomed Res. 2012, 25(1): 1-16.
6. Scallan E et al. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011, 17(1): 7-15.

7. Fotedar R et al. Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. Clin Microbiol Rev. 2007, 20(3):511-532.
8. Stark D et al. A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. Am J Trop Med Hyg. 2010, 82(4):614-9.
9. 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.