

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Cryptosporidium/Giardia Combi

Art. No.: C1121



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. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ist ein Enzym-immunoassay zum qualitativen Nachweis von *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* und/oder *Giardia lamblia* in humanen Stuhlproben.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

**Giardia lamblia** ist ein begeißelter Parasit, der nach der Aufnahme von Giardia-Zysten zu einer Infektion im menschlichen Dünndarm führt. Durch seine weltweite Verbreitung wird *Giardia lamblia* zu einer wichtigen Ursache von chronischen Durchfallerkrankungen, besonders bei Fragestellungen in der Reisemedizin. Die Infektion tritt nach der Ingestion von Zysten in kontaminierten Nahrungsmitteln und Wasser auf. In den USA ist *Giardia lamblia* der häufigste Erreger von Durchfallerkrankungen, die durch Wasseraufnahme verursacht werden. In Entwicklungsländern ist Giardia eine der häufigsten Krankheitsursachen bei Kindern unter zehn Jahren mit einer Prävalenz von 15 - 20 %. Die Giardiasis (Lambliasis) tritt als akute oder chronische Diarrhö auf, wobei auch asymptomatische Zystenausscheider vorkommen. Die Inkubationszeit liegt zwischen 3 und 42 Tagen.

Die akute Infektion zeigt folgende Symptome: Plötzliches Auftreten einer wässrigen Diarrhö (häufige, gelbliche, schaumige, übelriechende Stühle und Flatulenz), Appetitlosigkeit, Übelkeit, Lethargie und Gewichtsverlust. Die zur Diagnose einer Lambliasis in der Vergangenheit am häufigsten angewandte Methode war der mikroskopische Nachweis von Zysten im Stuhl, wofür erfahrendes Personal zur Verfügung stehen muss. Die Untersuchungen müssen außerdem über einen längeren Zeitraum an mehreren aufeinanderfolgenden Stuhlproben durchgeführt werden, da die Zystenausscheidung starken Schwankungen unterworfen ist.

Die **Cryptosporidiose** ist eine Protozoeninfektion, die durch die Gattung *Cryptosporidium* verursacht wird. Es handelt sich dabei um einen Parasiten, der bei Tieren weit verbreitet ist und als wichtiger pathogener Keim auch bei Nutztieren, besonders bei Kälbern, vorkommt.

Bei immun-kompetenten Patienten manifestiert sich die Erkrankung als selbstheilende Gastroenteritis. Die Diarrhö dauert zwischen 3 und 10 Tagen und kann von Fieber und gastrointestinalen Symptomen wie Übelkeit und Schmerzen begleitet werden, die denen der Giardiasis (Lambliasis) ähneln. Wesentlich schwerwiegender sind die Symptome und Auswirkungen bei immun-inkompetenten Patienten, bei denen die Diarrhöen sehr schwer verlaufen und persistieren. Die Übertragung der Infektion kann vom Tier auf den Menschen durch kontaminiertes Wasser und auch von Mensch zu Mensch erfolgen. Die in der Vergangenheit am häufigsten angewandte Methode zur Diagnose der Cryptosporidiose war der mikroskopische Nachweis von Oozysten im Stuhl bzw. die mikroskopische Untersuchung von Dünndarm-Biopsaten, wofür erfahrendes Personal zur Verfügung stehen musste.

Eine wichtige Alternativmethode zur Mikroskopie stellt der hier beschriebene Cryptosporidium/Giardia Combi-ELISA zur simultanen Untersuchung beider Erreger in Stuhlproben dar. Er ist in seiner Sensitivität den mikroskopischen Untersuchungen ebenbürtig, benötigt kein parasitologisch ausgebildetes Spezialpersonal, ist einfach und schnell durchzuführen und ist nicht auf

das Vorhandensein intakter Organismen (Zysten oder Trophozoiten) in der Stuhlprobe angewiesen.

### 3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi-Test werden spezifische monoklonale Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind sowohl Cryptosporidium- als auch Giardia-spezifische Antikörper gegen Antigene beider Erregerspezies gebunden. Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe sowie die Kontrollen werden zusammen mit biotinylierten Anti-Cryptosporidium- und Anti-Giardia-Antikörpern (Konjugat 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) zur Inkubation in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Waschschrift wird Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat (Konjugat 2) dazu gegeben und erneut bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Bei Anwesenheit von Cryptosporidien- und/oder Giardia-Antigenen bildet sich ein Sandwich-Komplex aus den immobilisierten Antikörpern, dem Cryptosporidium- und/oder Giardia-Antigen und den konjugierten Antikörpern. Nicht gebundenes Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen Cryptosporidien- und/oder Giardia- Antigene.

### 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

<b>Plate</b>	96 Best.	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Antigene von <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C. hominis</i> und <i>Giardia lamblia</i>
<b>Diluent   1</b>	100 ml	Probenverdünnungspuffer, Protein-gepufferte NaCl-Lösung; gebrauchsfertig; blau gefärbt
<b>Wash</b>	100 ml	Waschpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (10fach konz.); enthält 0,1% Thimerosal
<b>Control   +</b>	2 ml	Inaktiviertes Cryptosporidium- und Giardia-Antigen; gebrauchsfertig
<b>Control   -</b>	2 ml	Negativkontrolle (Probenverdünnungspuffer); gebrauchsfertig
<b>Conjugate   1</b>	13 ml	Biotin-konjugierte Antikörper gegen Cryptosporidium- und Giardia-Antigene in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; rot gefärbt
<b>Conjugate   2</b>	13 ml	Streptavidin-Poly-Peroxidase Konjugat in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; orange gefärbt
<b>Substrate</b>	13 ml	Wasserstoffperoxid/TMB; gebrauchsfertig
<b>Stop</b>	12 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 – 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 – 8 °C zu lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

### 6.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

### 6.2. Zubehör

- Probenröhrchen
- Einwegpipetten (Art. Nr.: Z0001)
- Vortex Mixer (optional, siehe 9.3.)
- Mikropipette für 50 – 100 µl und 1 ml Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620-650 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit 0,5 % Hypochloritlösung

## 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 Proben persönliche Schutzausrüstung (geignetes 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.

Weitere Details siehe Material Safety Data Sheets (MSDS): [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Die im Kit befindliche Positivkontrolle enthält inaktiviertes Cryptosporidium- und Giardia-Antigen. Sie sollte, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1% Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden

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

## **8. Sammlung und Lagerung der Proben**

Das Untersuchungsmaterial ist bis zur Verarbeitung bei 2 – 8 °C zu lagern. Kann das Material nicht innerhalb von 3 Tagen im Test eingesetzt werden, wird eine Lagerung bei –20 °C oder kälter empfohlen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden.

Stuhlproben oder Rektalabstriche sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit dem RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi Test auftreten können.

Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 100 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.

Bei Umgebungsuntersuchungen sollten auch Stuhlproben von klinisch unauffälligen Kontaktpersonen genommen werden, um asymptomatische Träger zu identifizieren.

## **9. Testdurchführung**

### **9.1. Allgemeines**

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte **Plate** auf Raumtemperatur

(20 – 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 – 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zur Vermeidung von Kreuzkontamination zu vermeiden.

Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

### **9.2. Herstellung des Waschpuffers**

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **Wash** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt.

Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

### 9.3. Vorbereitung der Proben

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen wird 1 ml RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 1** vorgelegt. Flüssiger Stuhl wird in eine Einwegpipette (Art. Nr. Z0001) bis kurz oberhalb der zweiten Verdickung aufgesaugt (ca. 100 µl) und im vorgelegten Puffer suspendiert.

Bei festem Stuhl wird eine äquivalente Menge Stuhl (ca. 50 - 100 mg) mit einem Spatel oder einer Einweg-Impföse entnommen und suspendiert.

Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt entweder durch Aufsaugen und Ausstoßen mit der Einwegpipette oder alternativ durch Mischen auf einem Vortex Mixer. Nach kurzem Stehenlassen (10 min) zur Sedimentation grober Stuhlpartikel kann der auf diese Weise geklärte Überstand der Stuhlsuspension direkt im Test eingesetzt werden. Erfolgt die Testdurchführung in einem ELISA-Automaten muss dieser Überstand partikelfrei sein. In diesem Fall empfiehlt sich eine Zentrifugation bei 2500g für 5 Minuten.

#### **Hinweis:**

Die im **Diluent | 1** verdünnten Stuhlproben können auch in allen anderen RIDASCREEN® ELISA eingesetzt werden die ebenfalls das **Diluent | 1** verwenden.

### 9.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden 100 µl der Positiv-Kontrolle **Control | +**, der Negativkontrolle **Control | -**, oder der Stuhlprobensuspension in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend werden 100 µl des Biotin-konjugierten Antikörpers **Conjugate | 1** zugegeben und nach Durchmischung (leichtes Tippen an den Plattenrand) für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

### 9.5. Waschen

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zur Erzielung korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter entleert und gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgt werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei der Verwendung von Waschautomaten oder ELISA-Vollautomaten ist die korrekte Einstellung des Gerätes zu beachten bzw. beim Hersteller zu erfragen. Geräte, die R-Biopharm liefert, sind bereits mit validierten Einstellungen und Arbeitsprotokollen programmiert. Um Verstopfungen von Waschnadeln zu vermeiden sollte gemäß der Probenvorbereitung (Pkt. 9.3.) nur partikelfreie Stuhlsuspension eingesetzt werden. Bei den Waschschrritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden.

## 9.6. Zweite Inkubation

100 µl des Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugates **Conjugate | 2** werden in die Kavitäten pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

## 9.7. Waschen

Waschen gemäß Pkt. 9.5.

## 9.8. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **Substrate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm gemessen (optional: 450/620 nm). Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen Luft - also ohne Mikrotiterplatte - erfolgen.

### **Hinweis:**

Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen.

## **10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall**

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, um Reagenzien-Stabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (OD) der Negativkontrolle bei 450 nm kleiner 0,2 (kleiner 0,160 bei 450/620 nm) und der gemessene Wert der Positivkontrolle bei 450 nm oder bei 450/620 nm größer 0,8 ist. Ist der Wert der Negativkontrolle größer 0,2 (0,160) kann dies ein Zeichen für ungenügendes Waschen sein. Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

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**

### 11.1. Berechnung des Grenzwertes

Zur Festlegung des Grenzwertes werden zu der gemessenen Extinktion der Negativkontrolle 0,15 Extinktionseinheiten hinzuaddiert.

$$\text{Cut-off} = \text{Extinktionswert der Negativkontrolle} + 0,15$$

## 11.2. Testergebnis

Als positiv werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert mehr als 10 % über dem errechneten Grenzwert liegt.

Als grenzwertig und zu wiederholen werden solche Proben bezeichnet, deren Extinktionswert im Bereich von 10 % oberhalb und unterhalb des Grenzwertes liegt. Fällt eine Wiederholungsuntersuchung mit einer frischen Stuhlprobe wieder in den Graubereich, so ist die Probe als negativ zu beurteilen.

Proben, die mehr als 10 % unter dem errechneten Grenzwert liegen, sind als negativ zu bewerten.

## 12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi-Test weist Antigen von *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* und/oder *Giardia lamblia* nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.

Ein negatives Ergebnis schließt weder eine mögliche Cryptosporidiose noch eine Giardiasis aus. Es kann durch intermittierende Ausscheidung der Erreger oder zu geringe Antigenmenge in der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit einem der beiden Erreger, sollte eine weitere Stuhlprobe untersucht werden.

Ein grenzwertiges Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung des Antigens in der Stuhlprobe verursacht werden. Deshalb sollte in einem solchen Fall eine zweite Suspension aus der gleichen Probe untersucht werden oder eine weitere Stuhlprobe zur Untersuchung angefordert werden.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1. Klinische Vergleichsstudie

In einer klinischen Studie in Großbritannien wurde der RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi-Test mit insgesamt 240 Stuhlproben (prospektive und verblindete retrospektive) untersucht. Es erfolgte ein Vergleich mit der dort etablierten Mikroskopie für Giardien (Iod-Färbung von Salzemulsionen) und Cryptosporidien (Auramin-Phenol und Zhiel-Neelsen-Färbung) sowie einer differenzierenden real-time PCR. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1:

Vergleich des RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi- ELISA mit Mikroskopie und real-time PCR



		Mikroskopie		real-time PCR	
		positiv	negativ	positiv	negativ
RIDASCREEN® Cryptosporidium / Giardia	positiv	25	24	47	2
	negativ	1	190	2	189

(KI: Konfidenzintervall)

Sensitivität (KI):	96 % (80-100)	96 % (86-100)
Spezifität (KI):	89 % (84-93)	99 % (96-100)

### 13.2. Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA wurde eine lineare Verdünnungsreihe einer Probe mit einer bekannten Anzahl an Cryptosporidien- und Giardia-Zysten hergestellt und in Triplikaten vermessen. Der LoD ist die Konzentration, die zuletzt in allen Replikaten positiv bewertet wurde. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 2 dargestellt

Tabelle 2: Analytische Sensitivität des RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA

Zysten Cryptosporidium/ Reaktionsansatz	MW [OD 450/620]	Ergebnis
5 x 10 <sup>5</sup>	1,728	positiv
2,5 x 10 <sup>5</sup>	0,740	positiv
1,25 x 10 <sup>5</sup>	0,449	positiv
6,25 x 10 <sup>4</sup>	0,216	positiv
3,12 x 10 <sup>4</sup>	0,104	negativ
1,56 x 10 <sup>4</sup>	0,053	negativ
7812	0,020	negativ
3906	0,016	negativ
Zysten Giardia/ Reaktionsansatz	MW [OD 450/620]	Ergebnis
1,25 x 10 <sup>5</sup>	1,630	positiv
6,25 x 10 <sup>4</sup>	0,803	positiv
3,12 x 10 <sup>4</sup>	0,440	positiv
1,56 x 10 <sup>4</sup>	0,191	positiv
7812	0,084	negativ
3906	0,049	negativ
1953	0,012	negativ

### 13.3. Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime des Intestinaltraktes wurden mit dem RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi- Test untersucht und zeigten mit Ausnahme von *Campylobacter coli* keine Kreuzreaktivität. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit unverdünnten Bakterien- oder Virussuspensionen, die eine Konzentration von  $10^6$  bis  $10^9$  Organismen pro ml aufwiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Kreuzreaktionen mit pathogenen Mikroorganismen

<b>Testkeim</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Mittelwert [OD 450/620]</b>
<i>Adenovirus</i>	Zellkulturüberstand	0,017
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Kultur	0,040
<i>Acrobacter butzleri</i>	Kultur	0,030
<i>Astrovirus</i>	Zellkulturüberstand	0,002
<i>Bacillus cereus</i>	Kultur	0,011
<i>Bacteroides fragilis</i>	Kultur	0,013
<i>Campylobacter coli</i>	Kultur	0,231
<i>Campylobacter jejuni</i>	Kultur	0,017
<i>Candida albicans</i>	Kultur	0,014
<i>Citrobacter freundii</i>	Kultur	0,018
<i>Clostridium difficile</i>	Kultur	0,011
<i>Clostridium perfringens</i>	Kultur	0,014
<i>Clostridium sordellii</i>	Kultur	0,017
<i>E. coli EPEC</i>	Kultur	0,015
<i>E. coli ETEC</i>	Kultur	0,020
<i>E. coli STEC</i>	Kultur	0,019
<i>Entamoeba histolytica</i>	Kultur	0,004
<i>Enterobacter cloacae</i>	Kultur	0,012
<i>Enterococcus faecalis</i>	Kultur	0,013
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kultur	0,017
<i>Proteus vulgaris</i>	Kultur	0,017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kultur	0,016
<i>Rotavirus</i>	Zellkulturüberstand	0,058
<i>Salmonella enteritidis</i>	Kultur	0,016
<i>Salmonella typhimurium</i>	Kultur	0,018
<i>Serratia liquefaciens</i>	Kultur	0,015
<i>Shigella flexneri</i>	Kultur	0,011
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kultur	0,035
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kultur	0,016
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Kultur	0,017
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Kultur	0,012

### 13.4. Präzision

Zur Bestimmung der Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurden 40 Replikate von 6 Referenzen gemessen, die den gesamten Messbereich von negativ bis hoch positiv abdecken. Die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten (VK) wurden für 3 Kit Lots ermittelt. Für die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurden die Referenzen an 10 verschiedenen Arbeitstagen mit 2 Läufen am Tag in Duplikaten gemessen. Die Messungen wurden mit 3 Kit Lots und von 3 Technikern durchgeführt. Die Inter-Lot Reproduzierbarkeit wurde über alle 3 Kit Lots ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Reproduzierbarkeit/Präzision des RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi Elisa

Referenz		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	MW [OD 450/620]	1,948	2,393	2,142	1,881	2,186	1,909	1,992
	VK (%)	8,42%	7,87%	6,74%	15,26%	8,79%	12,44%	14,58%
2	MW [OD 450/620]	1,653	2,033	1,584	1,543	1,778	1,551	1,624
	VK (%)	6,28%	6,65%	10,78%	15,94%	11,13%	13,04%	15,42%
3	MW [OD 450/620]	1,045	1,241	1,264	0,970	1,119	1,120	1,070
	VK (%)	7,08%	7,13%	6,99%	23,06%	16,75%	15,26%	19,58%
4	MW [OD 450/620]	0,839	0,918	0,863	0,721	0,848	0,768	0,779
	VK (%)	3,73%	6,03%	5,64%	22,42%	15,44%	15,77%	19,26%
5	MW [OD 450/620]	0,552	0,573	0,601	0,476	0,564	0,512	0,517
	VK (%)	10,42%	8,43%	4,55%	25,53%	17,20%	14,97%	20,72%
6	MW [OD 450/620]	0,285	0,348	0,298	0,302	0,347	0,302	0,317
	VK (%)	13,26%	6,97%	5,02%	23,43%	16,60%	22,27%	21,73%

### 13.5. Interferierende Substanzen

Die nachfolgend aufgeführten Substanzen zeigten keinen Effekt auf die Testergebnisse, wenn sie in den angegebenen Konzentrationen in Cryptosporidium- und Giardia- positive und negative Stuhlproben eingemischt wurden:

Bariumsulfat (Röntgenkontrastmittel; 18,5 % w/w), Loperamid (Antidiarrhoikum; 0,02 % w/w), Pepto-Bismol (Antidiarrhoikum; 6,6 % v/w), Cyclamat (Süßstoff; 1,3 % v/w), Metronidazol (0.5) (Antibiotikum; 3,0 % v/w), Stearinsäure / Palmitinsäure (Stuhlfette; Mischung 1:1, 40,0 % w/w), Diclofenac (Analgetikum; 0.1 % v/w).

Im Fall von Humanblut (5,0 % v/w) und Muzin (5,0 % w/w) wurden mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen untersucht:

Die Untersuchung einer Verdünnungsreihe mit Humanblut ergab keinen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration und den OD-Werten. Die einzige Ausnahme ist die höchste getestete Konzentration, die jedoch weit über der normalen physiologischen Konzentration lag. Daher ist eine Interferenz von Humanblut als eher unwahrscheinlich anzusehen. Die Testung von Muzin bestätigt den ersten Ansatz, da sich in allen Verdünnungsstufen der Cryptosporidium-positiven Proben durchgängig deutlich erniedrigte OD-Werte wiederholten. Dies wurde in den Giardia-positiven Stuhlproben nicht beobachtet. Dennoch ist Muzin als interferierende Substanz zu betrachten.

## Anhang

Testspezifische Symbole :

Plate	Mikrotiterplatte
Diluent   1	Probenverdünnungspuffer
Wash	Waschpuffer
Control   +	Positivkontrolle
Control   -	Negativkontrolle
Conjugate   1	Konjugat 1
Conjugate   2	Konjugat 2
Substrate	Substrat
Stop	Stopp-Reagenz

## Literatur

1. Clavel, A.: Evaluation of the optimal number of fecal specimens in the diagnosis of cryptosporidiosis in AIDS and immunocompetent patients. *Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 46-49 (1995).
2. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clinics in Laboratory Medicine* 11 (No. 4), 873 - 895 (1991).
3. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 (No. 3), 325 - 358 (1991).
4. Flanigan, T. P.: Human immunodeficiency virus infection and cryptosporidiosis: Protective immune responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (5) Suppl., 29 - 35 (1994).
5. Guarino, A. et al.: Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. *J. Infect. Dis.* 171, 976 - 983 (1995).
6. Hayes, E. B. et al.: Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *New. Engl. J. Med.* 320 (No. 21), 1372 - 1376 (1989).
7. Le Chevallier, M. W. et al.: Giardia and Cryptosporidium spp. in filtered drinking water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (No. 9), 2617 - 2621 (1991).
8. Mc. Anulty, J. M. et al.: A community wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool. *Jama* 272 (No. 20), 1597 - 1600 (1994).
9. Black, R. E. et al.: Giardiasis in day-care centers: Evidence of person-to-person transmission. *Pediatrics* 60 (No. 4), 486 - 491 (1977).
10. Craun, G. F.: Waterborne Giardiasis in the United States: A review. *Am. J. Pub. Health* 69 (No. 8), 817 - 819 (1979).
11. Nask, T. E. et al.: Experimental human infections with Giardia lamblia. *J. Infect. Dis.* 156 (No. 6), 974 - 984 (1987).
12. Smith, H. V. et al.: Giardia and Giardiasis: What's in a name? *Microbiol. Eur.* 3 (No. 1), 22 - 29 (1995).
13. Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A.: Giardia and Giardiasis. *Adv. Parasitol.* 32, 71 - 160 (1993).
14. Xiao, L.: Giardia infection in farm animals. *Parasitology today* 10 (No. 11), 436 - 438 (1994).
15. Schunk, M. et al.: Detection of Giardia lamblia and Entamoeba histolytica in stool samples by two enzyme immunoassays. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 389 - 391 (2001)