



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

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

Art. Nr.: PG1725
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 II ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. und *Entamoeba histolytica* in humanen Stuhlproben.

Die RIDA®GENE Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch Parasiten verursachten gastrointestinalen Infektion unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

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

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

Cryptosporidium parvum ist eine von mehreren Arten der Gattung *Cryptosporidium*. Neben *C. parvum* zählt *C. hominis* zu den häufigsten Verursachern einer Cryptosporidiose beim Menschen.⁶ Aber auch Infektionen durch weitere *Cryptosporidium* spp. wie z.B. *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, und *C. muris* können zu klinischen Symptomen führen.³ In den Industriestaaten wurden Cryptosporidien in bis zu 0,2 % bei gesunden Individuen und in etwa 2 % der Patienten mit Durchfällen nachgewiesen. In Entwicklungsländern liegt die Prävalenz mit bis zu 9 % sehr viel höher. Bei HIV infizierten Personen mit Durchfällen wurden bei 14 - 24 % der Fälle Cryptosporidien nachgewiesen, bei asymptomatischen HIV infizierten Personen in bis zu 5 %.^{4,5} Bei einem Ausbruch in Milwaukee (USA) im Jahr 1993 erkrankten mehr als 400.000 Menschen.⁶ Jedes Jahr treten in den USA schätzungsweise 748.000 Fälle von Cryptosporidiose auf.⁷ Die Infektion erfolgt

überwiegend durch die Aufnahme der Oozysten durch kontaminiertes Wasser und Lebensmittel, aber auch fäkal-orale Schmierinfektionen von Mensch zu Mensch sind möglich. Bei immunkompetenten Menschen manifestiert sich die Cryptosporidiose nach 2 - 10 Tagen als wässriger Durchfall und kann von Übelkeit, Unterleibschmerzen und Gewichtsverlust begleitet werden. Bei immunsupprimierten Menschen tritt oftmals ein schwerer Krankheitsverlauf auf, der mit einer lebensbedrohlichen chronischen Diarrhoe verbunden ist.^{2,6}

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.^{2,8}

Klassisch erfolgt die Diagnose von *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp. und *Entamoeba* durch mikroskopische Untersuchung von Stuhlproben, wofür erfahrenes Personal zur Verfügung stehen muss. Die RIDA®GENE Parasitic Stool Panel II 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 drei wichtigsten Durchfall verursachenden Parasiten (*G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp. und *E. histolytica*) erwiesen.

3. Testprinzip

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

Die amplifizierten Zielsequenzen von *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. 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 II Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

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

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x 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 Reagenzien – erforderliches Zubehör

- Der RIDA®GENE Parasitic Stool Panel II real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:
 - Extraktionsplattformen:
 - RIDA® Xtract (R-Biopharm)
 - Maxwell®16 (Promega)
 - Real-time PCR-Gerät:

Roche:	LightCycler® 480II
Agilent Technologies:	Mx3005P
Applied Biosystems:	ABI7500
Abbott:	m2000rt
Bio-Rad:	CFX96™
Cepheid:	SmartCycler®
QIAGEN:	Rotor-Gene Q
- Bemerkung: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden**

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

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

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Test die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

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

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

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

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Isolierung aus Stuhlproben

Für die DNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. z.B. RIDA[®] Xtract) 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 860 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®] GENE Parasitic Stool Panel II Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt.

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-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine 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 **Internal Control DNA** 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.

9.2 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.

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).

9.3 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

Bemerkung: Annealing und Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 bis 4 auf 5.0 eingestellt werden. In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 individuell eingestellt werden müssen.

Tab. 5: Real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, m2000rt und CFX96™

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

Bemerkung: Annealing und Extension finden im selben Schritt statt.

8.5 Detektionskanaleinstellung

Tab. 6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	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 spp.	618/660	
Cepheid SmartCycler®	Giardia lamblia	Kanal 1	Stellen Sie die „Man. Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 bis 4 auf 5.0 *
	ICD	Kanal 2	
	Entamoeba histolytica	Kanal 3	
	Cryptosporidium spp.	Kanal 4	
ABI 7500	Giardia lamblia	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	Entamoeba histolytica	ROX	
	Cryptosporidium spp.	Cy5	
Abbott m2000rt	Giardia lamblia	FAM	-
	ICD	VIC	
	Entamoeba histolytica	ROX	
	Cryptosporidium spp.	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	Giardia lamblia	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	Entamoeba histolytica	ROX	
	Cryptosporidium spp.	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Giardia lamblia	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	Entamoeba histolytica	Orange	
	Cryptosporidium spp.	Red	
Bio-Rad CFX96™	Giardia lamblia	FAM	-
	ICD	VIC	
	Entamoeba histolytica	ROX	
	Cryptosporidium spp.	Cy5	

*In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 individuell eingestellt werden müssen.

10. Qualitätskontrolle

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. Tab. 7, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

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

Tab. 7: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
PTC	Positiv	NA ^{*1}	Siehe QAC
NTC	Negativ	Ct > 20	0

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

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

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

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

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

Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (*Giardia lamblia*) auf dem LightCycler® 480II

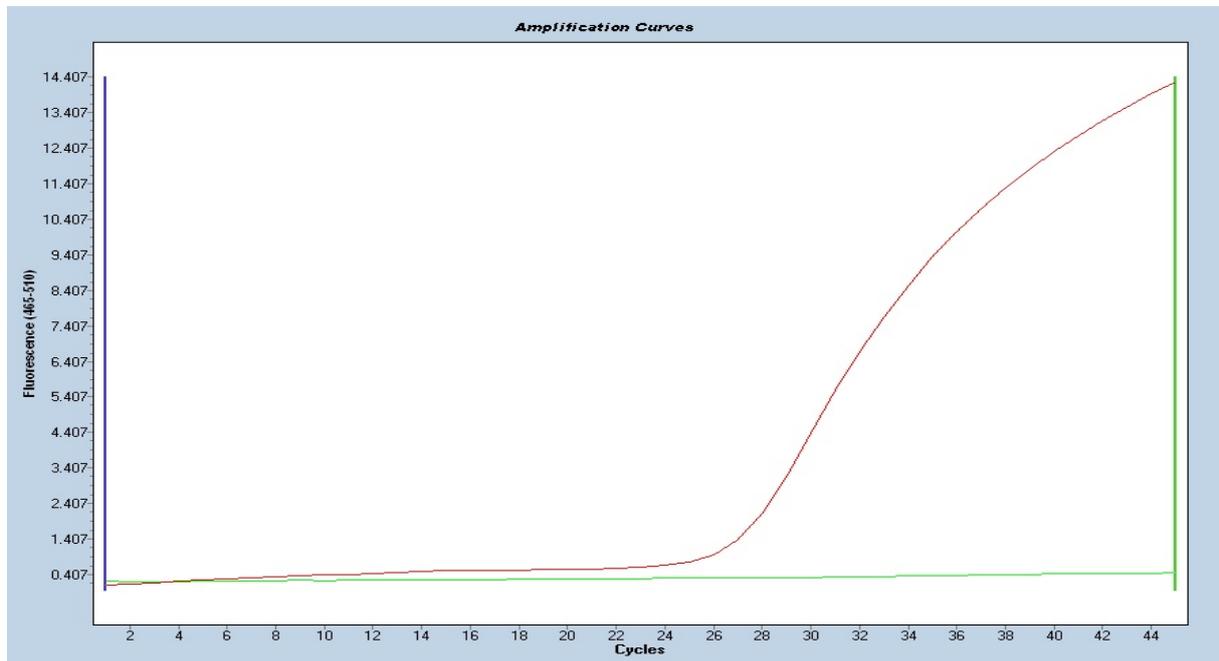


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (*Entamoeba histolytica*) auf dem LightCycler® 480II

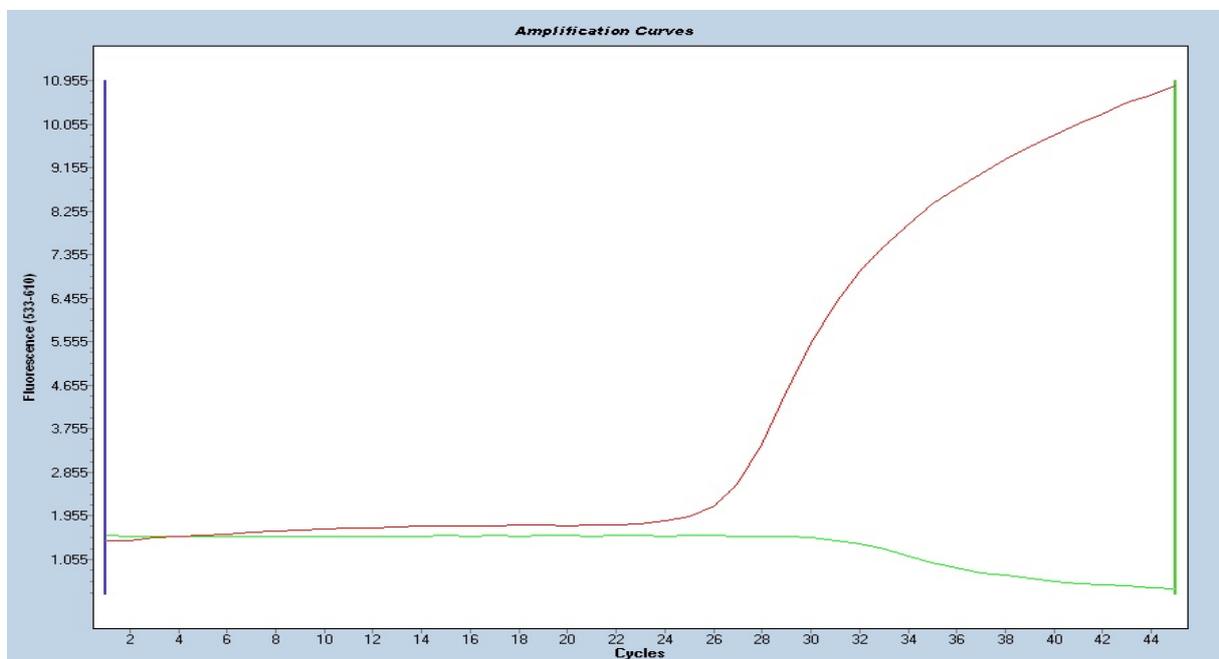
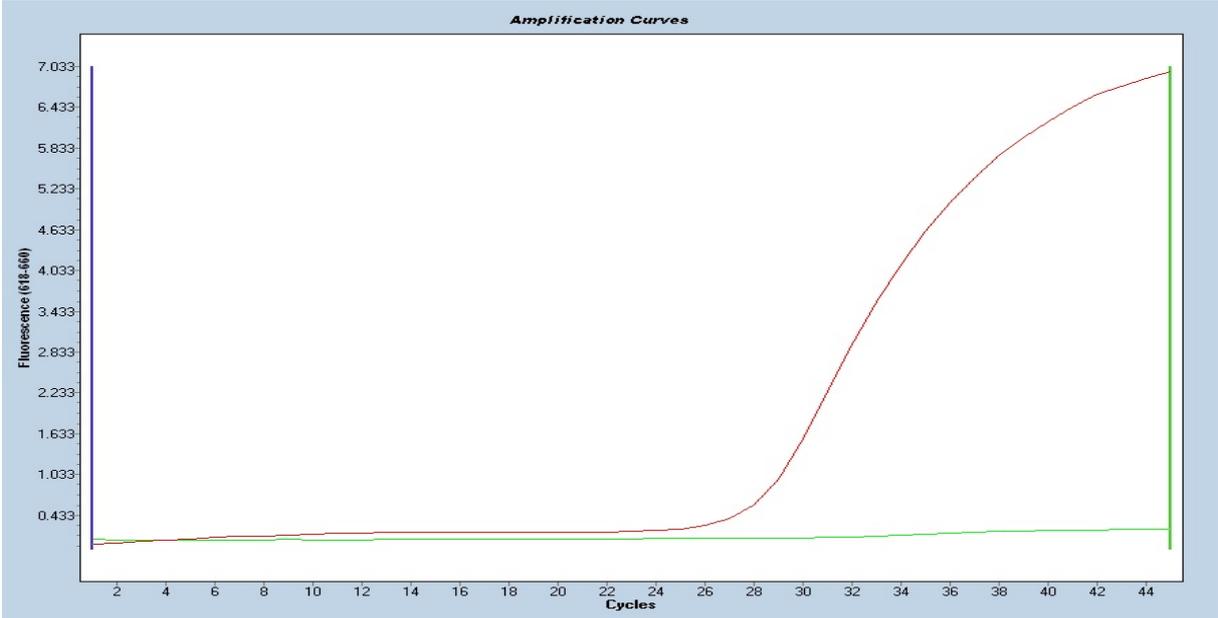


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Cryptosporidium spp.) auf dem LightCycler® 480II



11. Auswertung und Interpretation

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene				
Giardia lamblia	E. histolytica	C. spp.	ICD	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	G. lamblia nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	E. histolytica nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	C. spp. nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	G. lamblia und E. histolytica nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	G. lamblia und C. spp. nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	E. histolytica und C. spp. nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	G. lamblia, E. histolytica und C. spp. nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene sind nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Giardia lamblia, Entamoeba histolytica und Cryptosporidium spp. sind nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt und eine Amplifikation für die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem zu sehen ist.

Giardia lamblia, Entamoeba histolytica und Cryptosporidium spp. sind ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem zu sehen ist. 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 und Cryptosporidium spp. sind nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt 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 spp. und die Internal Control DNA (ICD) keine Amplifikation 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.

12. 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 Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregion können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II 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-ITS) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 100 DNA-Kopien/Reaktion für *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp.* und *Entamoeba histolytica* (s. Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6).

Abb. 4: Verdünnungsreihe *Giardia lamblia* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

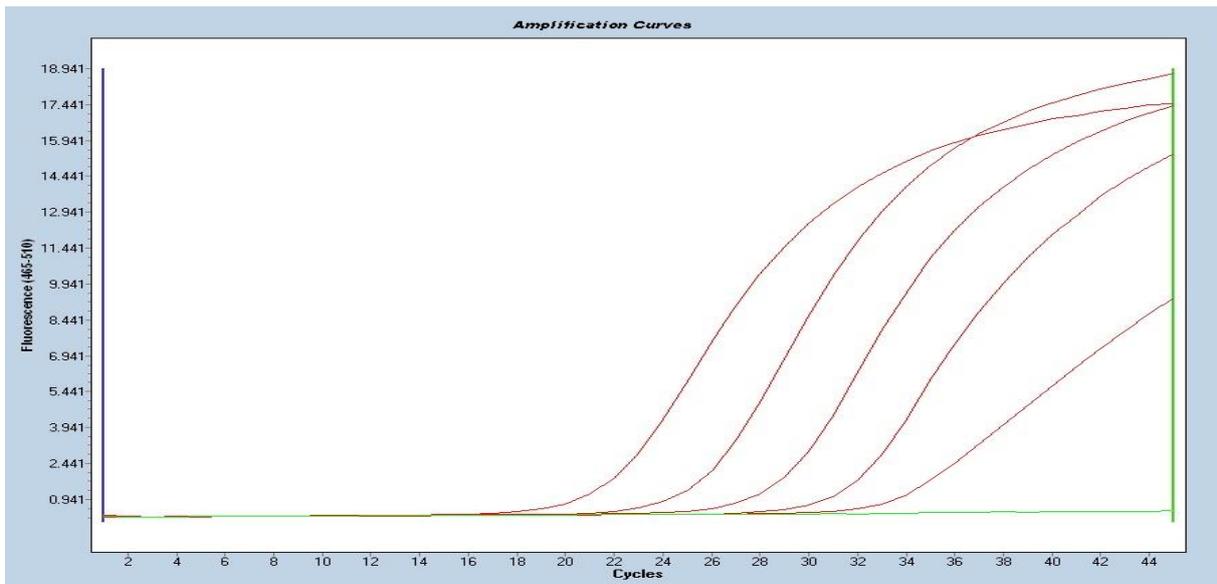


Abb. 5: Verdünnungsreihe *Entamoeba histolytica* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

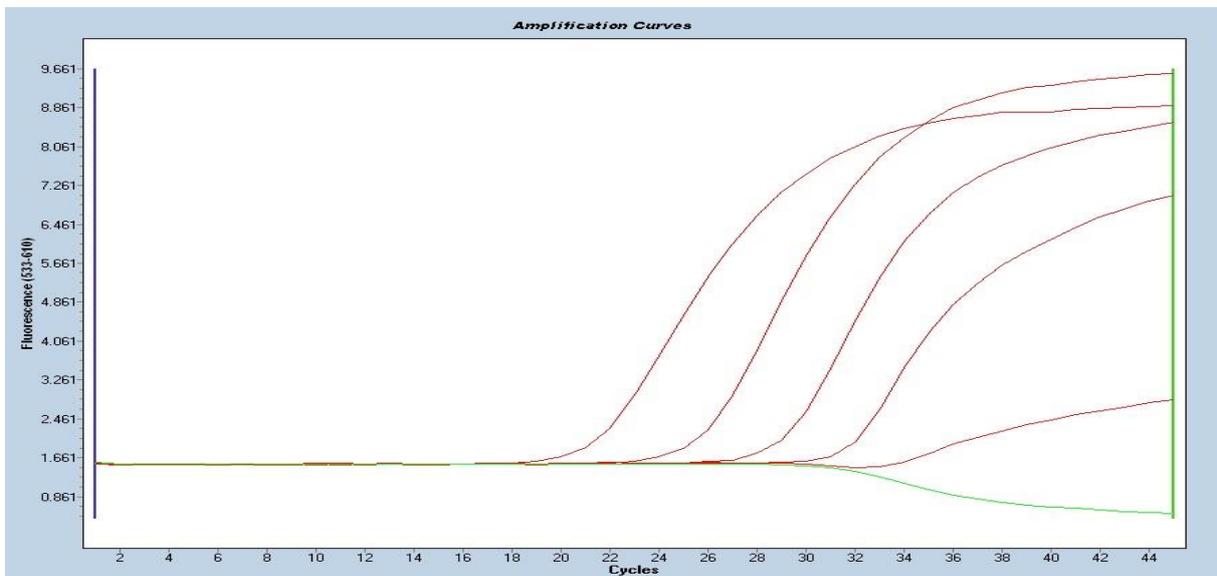
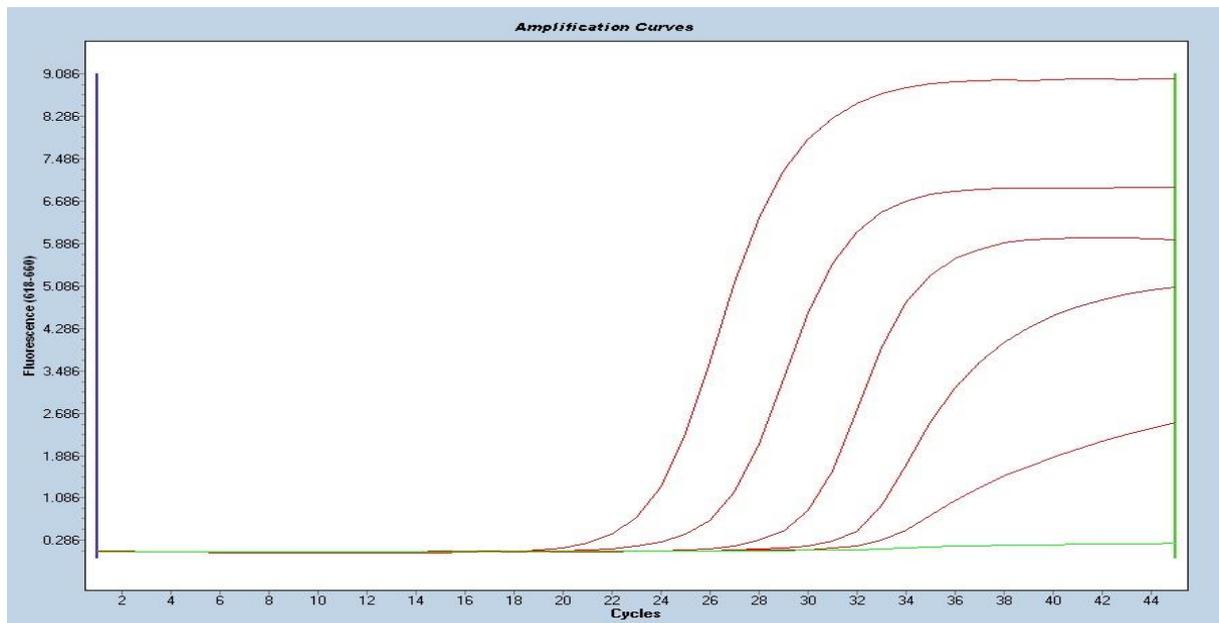


Abb. 6: Verdünnungsreihe *Cryptosporidium spp.* (10^5 – 10^1 DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II



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

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp.* und *Entamoeba histolytica*. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 9):

Tab. 9: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GG II	-	Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-		
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus Zellkultur	-		
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. Fetus	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-		
<i>Campylobacter lari</i> subsp. Lari	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-		
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-		
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-		
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-		
Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	-	Adenovirus 7, Human, Strain Gomen	-				

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II real-time PCR wurde mit *Cryptosporidium spp.* untersucht (s. Tab. 10). Alle getesteten *Cryptosporidium spp.* Stämme wurden mit der RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II real-time PCR nachgewiesen.

Tab. 10: Analytische Reaktivitätstestung

<i>Cryptosporidium spp.</i>					
<i>C. parvum</i>	+	<i>C. xiaoi</i>	+	<i>C. sp horse</i>	+
<i>C. hominis</i>	+	<i>C. sp skunk</i>	+	<i>C. ubiquitum</i>	+
<i>C. baileyi</i>	+	<i>C. canis</i>	+	<i>C. bovis</i>	+
<i>C. cuniculus</i>	+	<i>C. viatorum</i>	+	<i>C. felis</i>	+

Literatur

1. Centers for Disease Control and Prevention 2011. Giardia Epidemiology & Risk Factors, <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>. Aufgerufen am 10.07.2012.
2. Food and Drug Administration (FDA) 2011. Bad Bug Book 2nd Edition. <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/default.htm>. Aufgerufen am 10.07.2012.
3. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>. Aufgerufen am 07.03.2014.
4. Robert Koch Institut 2010. Kryptosporidiose (*Cryptosporidium parvum*). RKI-Ratgeber für Ärzte 2004. Aufgerufen am 24.07.2012.
5. 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.
6. Leitch GJ und Qing He. Cryptosporidiosis - an overview. J Biomed Res. 2012, 25(1): 1-16.
7. Scallan E et al. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011, 17(1): 7-15.
8. Fotedar R et al. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev. 2007, 20(3):511-532.