



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 Dientamoeba fragilis
real-time PCR

Art. Nr.: PG1745
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 Dientamoeba fragilis ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Dientamoeba fragilis aus humanen Stuhlproben.¹ Die RIDA®GENE Dientamoeba fragilis real-time PCR soll die Diagnose einer durch Dientamoeba fragilis verursachten gastrointestinalen Infektion unterstützen.

2. Erläuterung

Dientamoeba fragilis gehört zu den wichtigsten Diarrhoe verursachenden Protozoen und ist weltweit verbreitet. Jüngste Studien haben den Erreger als häufige Ursache einer Gastroenteritis nachgewiesen. Eine Infektion mit Dientamoeba fragilis kann entweder symptomatisch oder asymptomatisch sein. Die Symptome der Dientamoebiasis sind Bauchschmerzen und Durchfall. Die Prävalenz von Dientamoeba fragilis variiert von 0,3 % bis zu 52 % und übertrifft oft die von Giardia lamblia.^{2,3}

Klassisch erfolgt die Diagnose von Dientamoeba fragilis durch mikroskopische Untersuchung von Stuhlproben, wofür erfahrenes Personal zur Verfügung stehen muss. Die RIDA®GENE Dientamoeba fragilis real-time PCR ist eine neue und attraktive Alternativmethode zur Untersuchung von Stuhlproben und hat sich als hoch sensitiv und spezifisch für den Nachweis von Dientamoeba fragilis erwiesen.

3. Testprinzip

RIDA®GENE Dientamoeba fragilis ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Dientamoeba fragilis aus humanen Stuhlproben. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente für Dientamoeba fragilis (18s-ITS) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen von Dientamoeba fragilis werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE Dientamoeba fragilis 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 Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit für Stuhlproben (z.B. RIDA[®] Xtract) oder DNA-Extraktionssysteme für Stuhlproben (z.B. Maxwell[®] 16 (Promega), NucliSENS easy[®]MAG[™] (bioMérieux))

- Real-time PCR-Gerät:

Roche: LightCycler[®] 2.0, LightCycler[®] 480II

Cepheid: SmartCycler[®]

Applied Biosystems: ABI 7500

Abbott: m2000rt

Stratagene: Mx3005P

QIAGEN: Rotor-Gene Q

Bio-Rad: CFX96[™]

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

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler[®] 2.0 (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. 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 3.000 rpm zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®]GENE Dientamoeba fragilis 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-Lysispuffer 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).

8.4 Geräteeinstellungen

Tab.4: Real-time PCR Profil für LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, SmartCycler® und Rotor-Gene Q

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

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

Hinweis: Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die Man. Grenzwert Flour. Einheiten für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 auf 5.0 eingestellt werden.

Tab.5: Real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI 7500, m2000rt und CFX96™

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

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

8.5 Detektionskanaleinstellung

Tab.6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

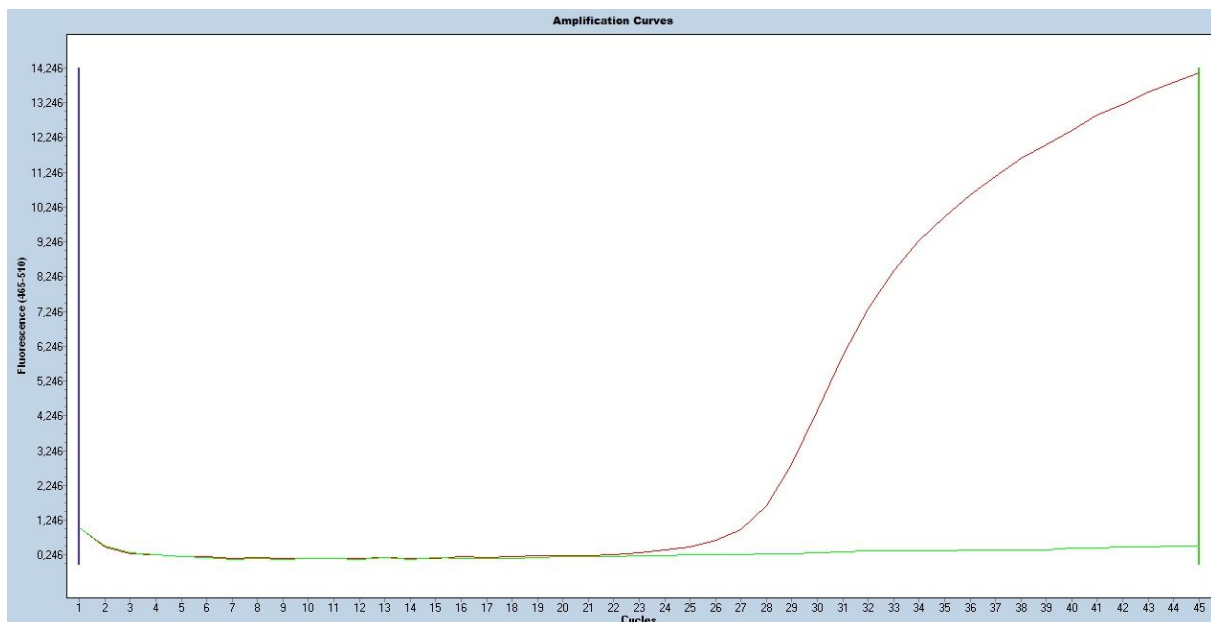
Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	Dientamoeba fragilis	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	Dientamoeba fragilis	465/510	Eine Color Compensation wird nicht benötigt
	ICD	533/580	
Cepheid SmartCycler®	Dientamoeba fragilis	Kanal 1	Stellen Sie die Man. Grenzwert Flour. Einheiten für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 auf 5.0 ein
	ICD	Kanal 2	
ABI 7500	Dientamoeba fragilis	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
Abbott m2000rt	Dientamoeba fragilis	FAM	-
	ICD	VIC	
Stratagene Mx3005P	Dientamoeba fragilis	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	Dientamoeba fragilis	Green	-
	ICD	Yellow	
Bio-Rad CFX96™	Dientamoeba fragilis	FAM	-
	ICD	HEX	

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.1).

Die Positivkontrolle liegt für *Dientamoeba fragilis* 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.

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



Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 7.

Tab.7: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von <i>Dientamoeba fragilis</i>-spezifischem Zielgen		
<i>Dientamoeba fragilis</i>	ICD	Ergebnis
positiv	positiv/negativ	D. fragilis nachweisbar
negativ	positiv	Zielgen ist nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

Dientamoeba fragilis ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Dientamoeba fragilis ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation aufweist, die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem jedoch keine Amplifikation 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 internen Amplifikationskontrolle führen können.

Dientamoeba fragilis ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die Internal Control DNA (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA (ICD) ausgeschlossen werden.

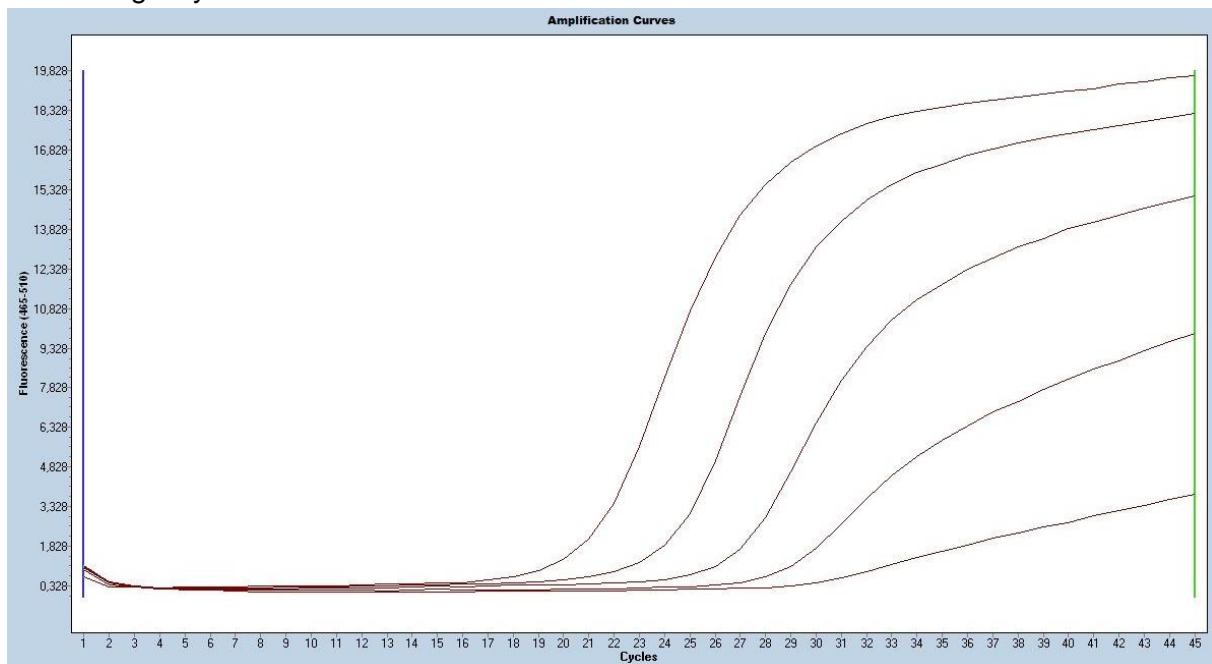
Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem keine Amplifikation zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden oder es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR Wasser verdünnt und erneut amplifiziert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

10. Testmerkmale

10.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis* real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 5 DNA-Kopien/Reaktion (s. Abb. 2).

Abb.2: Verdünnungsreihe *Dientamoeba fragilis* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II



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

10.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Dientamoeba fragilis real-time PCR ist spezifisch für Dientamoeba fragilis aus humanen Stuhlproben. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab.8):

Tab.8: Kreuzreaktivitätstestung

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

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 Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.

4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE *Dientamoeba fragilis* 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 das Zielgen für *Dientamoeba fragilis* (18s-ITS) vorhanden ist.

12. Literatur

1. Calderaro A et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010, 67(3):239-245.
2. Stark D et al. A review of the clinical presentation of *dientamoebiasis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2010, 82(4):614-619.
3. 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.