



## RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel

**REF** PG0705



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Deutschland  
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Norovirus (Genogruppe I und II), Rotavirus und der *Clostridium difficile* Toxin-Gene A (tcdA) / B (tcdB) in humanen Stuhlproben.

Die RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR soll die Diagnose einer im Krankenhaus erworbenen Gastroenteritis unterstützen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Nosokomiale Diarrhöen sind im Krankenhaus erworbene Durchfallerkrankungen, die definitionsgemäß nach 72 Stunden Krankenhausaufenthalt auftreten (3-Tage-Regel). Eine nosokomiale Diarrhö kann eine infektiöse oder nicht-infektiöse (z.B. durch Medikamente oder Chemotherapie) Ursache haben und betrifft bis zu ein Drittel der Krankenhauspatienten. Der bedeutendste und häufigste Erreger einer nosokomialen Diarrhö ist *Clostridium difficile*. Neben *Clostridium difficile* sind Noroviren und Rotaviren von besonderer Bedeutung. Nosokomiale Diarrhöen können schwerwiegende Komplikationen bei Patienten verursachen, verlängern den Krankenhausaufenthalt und erhöhen die Kosten.<sup>1,2,3,4</sup>

Noroviren verursachen mit Abstand die meisten Fälle aller nicht bakteriellen Gastroenteritis-Ausbrüche.<sup>5,6,7</sup> Eine durch Noroviren verursachte Gastroenteritis äußert sich durch starke Übelkeit, heftiges Erbrechen und schweren Durchfall. Noroviren werden sowohl mit dem Stuhl als auch mit dem Erbrochenen ausgeschieden. Eine aerogene Übertragung durch Bildung virushaltiger Aerosole ist häufig die Ursache einer sehr raschen Ausbreitung in Gemeinschaftseinrichtungen.<sup>8,9,10</sup> Das Center for Disease Control (CDC, Atlanta, USA) schätzt, dass jedes Jahr in den USA durch Noroviren über 21 Millionen Fälle von akuter Gastroenteritis, 70.000 Krankenhausaufenthalte und 800 Todesfälle verursacht werden.<sup>11</sup> Noroviren gehören zur Familie der Caliciviridae und sind kleine, unbehüllte Viren mit einer einzelsträngigen RNA (ssRNA). Sie lassen sich in 7 Genogruppen mit derzeit über 30 verschiedenen Genotypen und einer Vielzahl von Stämmen unterteilen. Als humanpathogen sind bisher nur Vertreter aus der Genogruppe I (GGI) mit 9 Genotypen und aus der Genogruppe II (GGII) mit 22 Genotypen, sowie Vertreter aus der Genogruppe IV beschrieben.<sup>18,19</sup>

Rotaviren gehören zur Familie der Reoviridae. Es handelt sich dabei um unbehüllte, ikosaedrische, doppelsträngige RNA (dsRNA) Viren. Man unterscheidet 7 Serogruppen (A - G). Humanpathogene Rotaviren sind in den Serogruppen A - C enthalten, wobei mehr als 90 % der Infektionen durch Rotaviren der Serogruppe A verursacht werden.<sup>12</sup> Die Symptome einer Rotavirus-Infektion sind meist Erbrechen, Durchfall und Abdominalschmerzen. Das Virus wird fäkal-oral, besonders durch Schmierinfektionen übertragen. Rotavirus ist bei Kindern unter fünf Jahren die Hauptursache einer Diarrhö und weltweit verantwortlich für den Tod von schätzungsweise 611.000 Kindern jährlich.<sup>13</sup>

Die Erstbeschreibung von *Clostridium difficile*, eines gram-positiven, sporenbildenden, anaeroben Bakteriums, erfolgte 1935 durch Hall und O'Toole, die die Darmflora gesunder Säuglinge untersuchten.<sup>14</sup> Erst in den späten 1970er wurde *Clostridium difficile* als Erreger der Antibiotika-assoziierten Diarrhö sowie der pseudomembranösen Kolitis identifiziert.<sup>15</sup> Heute ist *Clostridium difficile* einer der häufigsten Erreger der nosokomialen Diarrhö. *Clostridium difficile* ist die Hauptursache bei 15 – 25 % aller Patienten mit Antibiotika-assoziiierter Diarrhö und bei fast allen Patienten mit pseudomembranöser Kolitis.<sup>16</sup> Prädisponierende Risikofaktoren für eine *Clostridium difficile* assoziierte Diarrhö sind z.B. Antibiotikatherapie, Alter des Patienten, sowie Länge und Anzahl der Krankenhausaufenthalte. Zunehmend erkranken aber auch nicht Antibiotika-therapierte und nicht hospitalisierte Patienten an einer *Clostridium difficile* Infektion. Die Krankheitssymptome reichen von leichten Durchfällen über Darmentzündungen unterschiedlicher Schwere bis hin zur pseudomembranösen Kolitis, der schwersten Form der Antibiotika-assoziierten Diarrhö. Die klinische Symptomatik wird durch toxische Stämme von *Clostridium difficile*, die das Toxin A und Toxin B produzieren, hervorgerufen. In den letzten Jahren stiegen Anzahl und Schwere der Erkrankungen weltweit an.<sup>17</sup>

Die real-time RT-PCR erlaubt einen schnellen, hochsensitiven und spezifischen Nachweis für die Ursache einer infektiösen Diarrhö. Eine frühe und zuverlässige Diagnose des Diarrhö verursachenden Erregers ermöglicht eine schnelle spezifische Behandlung des Krankenhauspatienten und die Einleitung von Hygienemaßnahmen, um eine nosokomiale Übertragung zu verhindern.

### 3. Testprinzip

RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Norovirus (Genogruppe I und II), Rotavirus und der *Clostridium difficile* Toxin-Gene A (tcdA) / B (tcdB) in humanen Stuhlproben.

Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR Format, d.h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA (Norovirus, Rotavirus) wird dabei mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die spezifischen Genfragmente für Norovirus GGI und GGII (ORF1/ORF2 junction Region), Rotavirus (NSP3) und *Clostridium difficile* Toxin A / B (tcdA / tcdB) werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optischen Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel Test enthält eine **Internal Control RNA**

(ICR) 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	1050 µl	gelb
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rot
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	braun
N	No Template Control	1x	450 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 **20 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 Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

**Tab. 2: Benötigtes Zubehör**

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z

Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Hinweis: 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](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und des **LightCycler® 480 z**
- 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
- **PCR-Wasser (Nuklease-frei)**

## 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 Tests 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 Safety Data Sheets (SDS) unter [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 DNA/RNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA/RNA-Präparation aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell<sup>®</sup> RSC (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 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel Test enthält eine **Internal Control RNA** die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control RNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control RNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control RNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control RNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control RNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 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 Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab.3, Tab.4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, den **Enzyme-Mix** die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control RNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

**Tab. 3:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

**Tab. 4:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

## 9.2 Herstellung des PCR-Mix

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

**Negativkontrolle:** Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

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

**Proben:** Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Positivkontrolle:** Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

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

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die real-time RT-PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab.5, Tab.6).

## 9.3 Geräteeinstellungen

### 9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

**Tab. 5:** Universal real-time RT-PCR Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im Schritt statt.

**Tab. 6:** Universal real-time RT-PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

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

**Hinweis:** Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.



## 9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	540/580	
	Rotavirus	540/610	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICR	Yellow	
	Rotavirus	Orange	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Red	

## 10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

**Tab. 8:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA <sup>*1</sup>	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

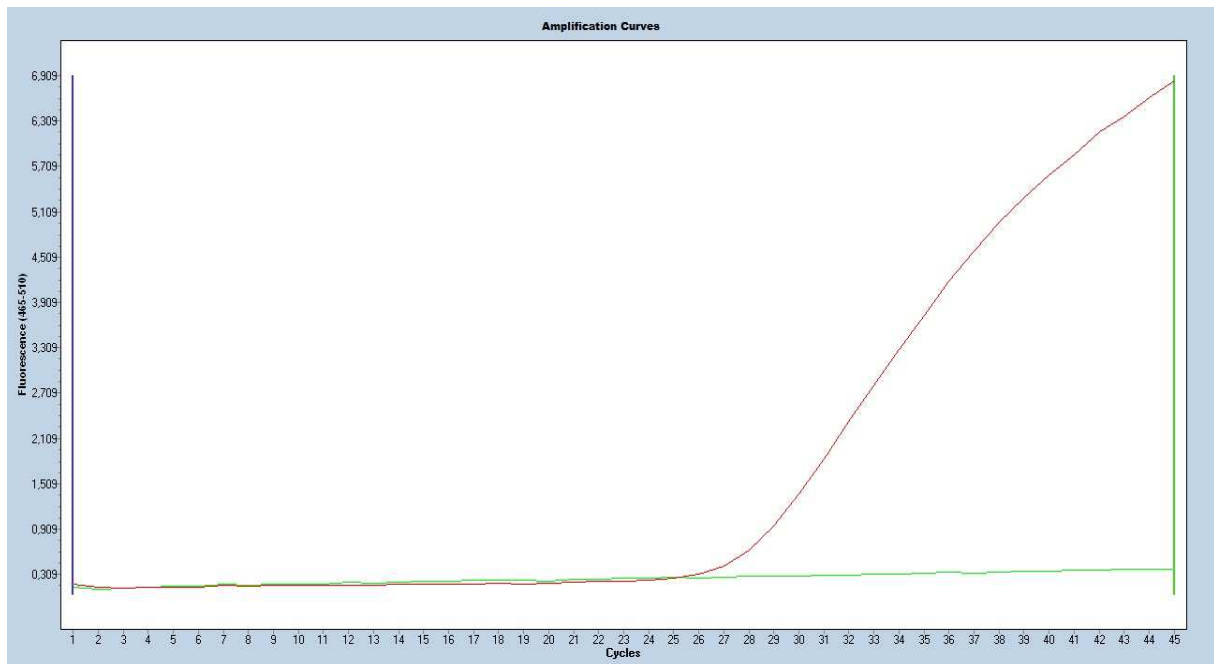
<sup>\*1</sup> Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

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

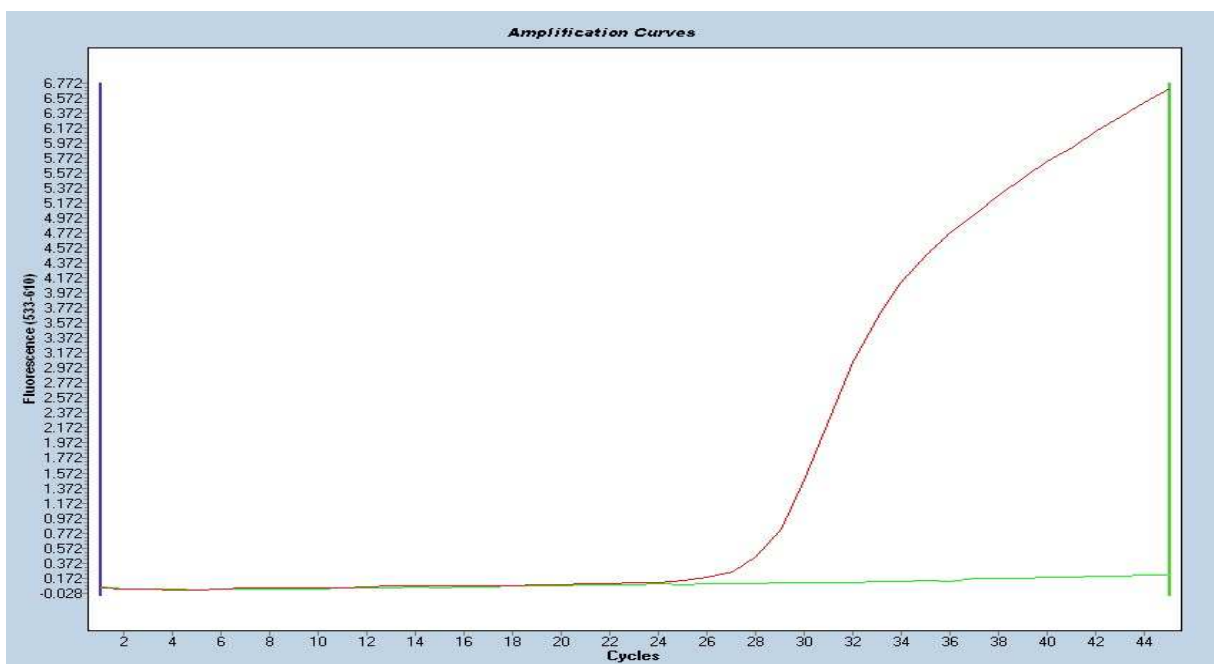
Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

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

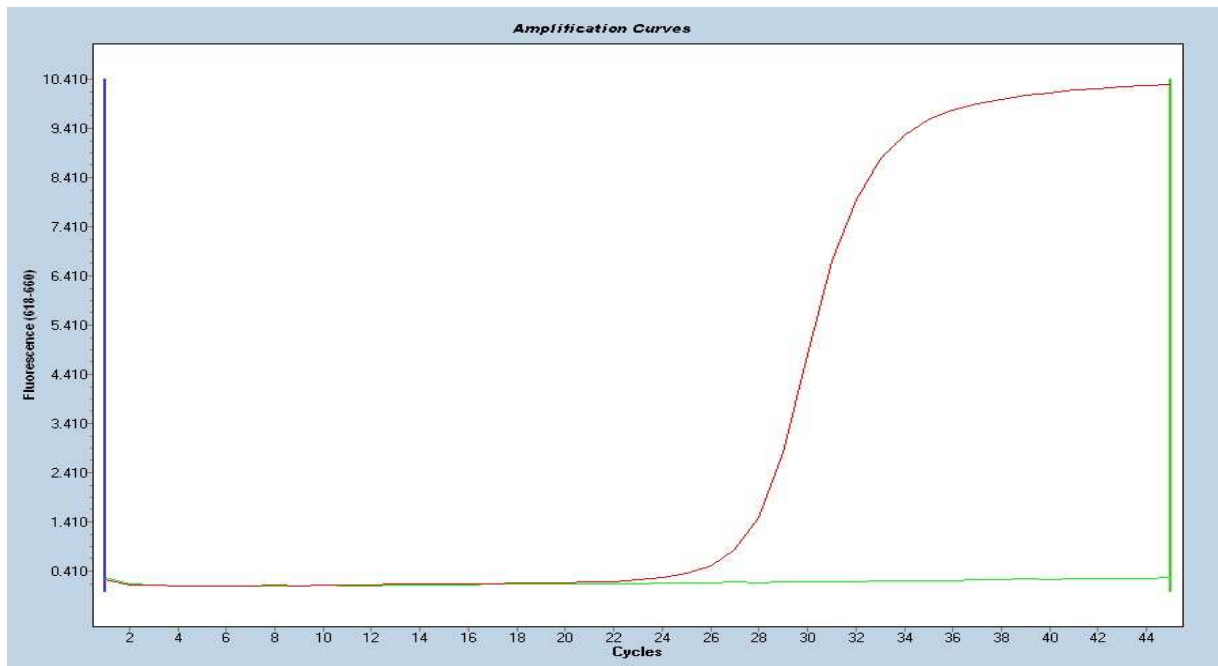
- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb. 1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Norovirus) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 2:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Rotavirus) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 3:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Clostridium difficile* Toxin-Gene A/B) auf dem LightCycler® 480II

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

**Tab. 9:** Interpretation der Ergebnisse

Nachweis				
Norovirus	Rotavirus	<i>C. difficile</i> Toxin-Gene A/B	ICR	Ergebnis
<b>positiv</b>	negativ	negativ	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Norovirus nachweisbar</b>
negativ	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Rotavirus nachweisbar</b>
negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv/ negativ</b>	<b><i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Norovirus und Rotavirus nachweisbar</b>
negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Rotavirus und <i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Norovirus und <i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Norovirus, Rotavirus und <i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar</b>
negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>Zielgene sind nicht nachweisbar</b>
negativ	negativ	negativ	negativ	<b>Ungültig</b>

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

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die Internal Control RNA jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der Internal Control RNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control RNA führen können.

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

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control RNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. 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 der Methode

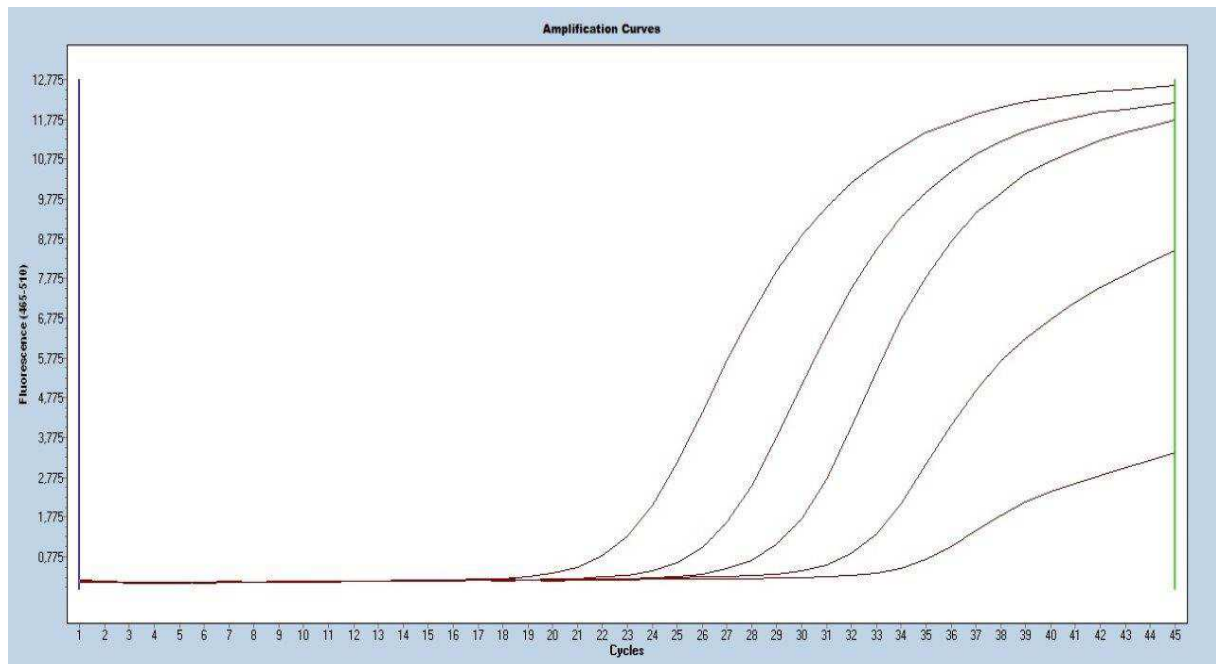
1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhlproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung 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 der Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital 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 entsprechenden Zielgene (Norovirus: ORF1/ORF2 junction Region, Rotavirus: NSP3, *Clostridium difficile* Toxin A/B: tcdA/tcdB) vorhanden sind.
8. Noroviren der Genogruppe IV, die in sehr seltenen Fällen auch Menschen infizieren können, werden ebenfalls mit dem RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel Test nachgewiesen.
9. Rotaviren der Serogruppe B und C werden nicht mit dem RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel Test nachgewiesen.

## 13. Leistungsmerkmale

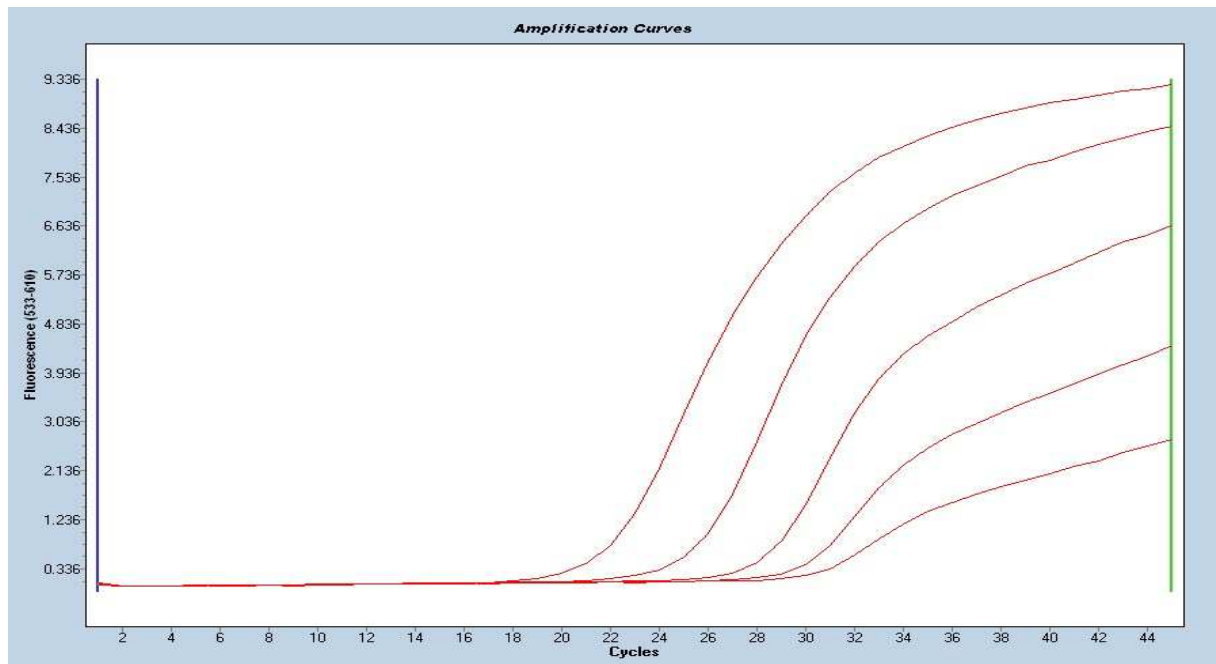
### 13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze  $\geq 50$  Kopien/Reaktion.

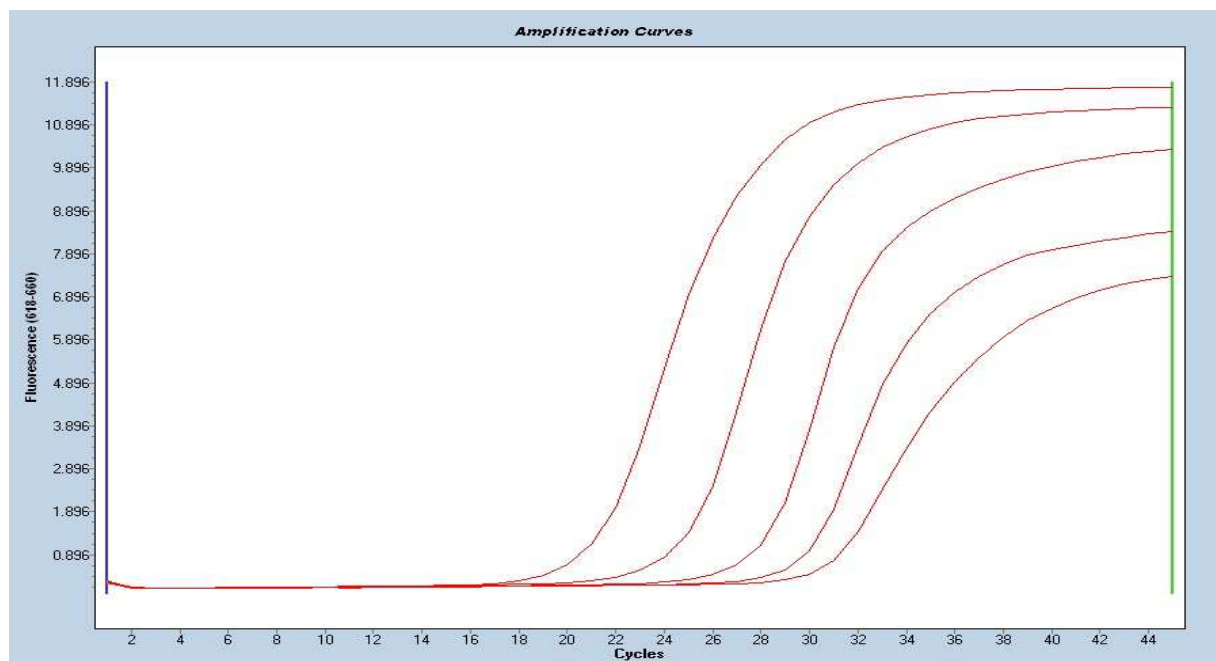
Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen eine Verdünnungsreihe jeweils von Norovirus und Rotavirus ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien/ $\mu$ l) sowie der *Clostridium difficile* Toxin-Gen A/B ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Abb. 4:** Verdünnungsreihe Norovirus ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Abb. 5:** Verdünnungsreihe Rotavirus ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 6:** Verdünnungsreihe *C. difficile* Toxin-Gene A/B ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, der Nukleinsäureextraktion und dem Nukleinsäuregehalt.



## 13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Norovirus (Genogruppe I, II und IV), Rotavirus (Serogruppe A) und *Clostridium difficile* Toxin-Gene A/B. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 10):

**Tab. 10:** Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium bif fermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

### 13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Genotypen der Norovirus Genogruppe I, II und IV und verschiedenen Serotypen der Rotavirus Spezies A untersucht (s. Tab. 11). Alle Norovirus-Genotypen und Rotavirus-Serotypen des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR nachgewiesen.

**Tab. 11:** Analytische Reaktivitätstestung










Norovirus					
<b>Genogruppe I</b>					
GGI.1 – Norwalk	+	GGI.3 – Desert Shield, Birmingham	+	GGI.6 – Hesse	+
GGI.2 – Southampton, Whiterose	+	GGI.4 – Chiba, Malta	+	GGI.7 – Winchester	+
GGI.2 – Southampton, Southampton	+	GGI.5 – Musgrove	+	GGI.8 – Boxer	+
<b>Genogruppe II</b>					
GGII.1 – Hawaii	+	GGII.4 – Sydney 2012	+	GGII.17 – Kawasaki	+
GGII.2 – Melksham	+	GGII.6 – Seacroft	+	GGII.b – Hilversum	+
GGII.3 – Toronto	+	GGII.7 – Leeds	+	GGII.c – Den Haag	+
GGII.4 – Bristol, Grimsby 2004	+	GGII.10 – Erfurt	+		
<b>Genogruppe IV</b>					
GGIV.1 – Alphatron	+				
Rotavirus					
<b>Serogruppe A</b>					
Serotyp G1	+	Serotyp G2	+	Serotyp G3	+
Serotyp G4	+	Serotyp G9	+	Serotyp G12	+

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-09-20	Generelle Überarbeitung 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 12. Grenzen der Methode 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

## 16. Literatur

1. Polage CR *et al.* Nosocomial Diarrhea: Evaluation and Treatment of Causes Other Than *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*. 2012.
2. Bartel B *et al.* Nosocomial diarrhea: a review of pathophysiology, etiology, and treatment strategies. *Hosp Pract*. 2012; 40(1):130-138.
3. Weis S *et al.* Nosokomiale Diarrhö. *Internist* 2011; 51:167-178.
4. Pawlowski SW *et al.* Diagnosis and Treatment of Acute or Persistent Diarrhea. *Gastroenterology* 2009 ; 136(6): 1874–1886.
5. Mead PS *et al.* Food- related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:607-625.
6. Glass RJ *et al.* The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S254-261.
7. Evan HS. General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996. *Commun Dis Public Health* 1:165-171.
8. Johnston CP *et al.* Outbreak management and implications of a nosocomial Norovirus outbreak. *CID* 2007; 45:534-540.
9. Corwin AL *et al.* Shipboard impact of a probable Norwalk virus outbreak from coastal Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(6)898-903.
10. Kaplan JE *et al.* An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home: demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* 1982; 116:940-948.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
12. Wilhelmi I *et al.* Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol infect* 2003, 9: 247-262.
13. Parashar UD *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2): 304-306.
14. Hall IC *et al.* Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935, 49: 390–402.
15. Bartlett JG *et al.* Antibiotica-associated pseudomembranous colitis due to a toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 1978; 298:531-543.
16. Bartlett JG *et al.* Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *CID* 2008, 46: S12-18.
17. Bartlett JG. Narrative Review: The new Epidemic of *Clostridium difficile* - Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.
18. Parra GI *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017; 13(1): e1006136.

19.11. Vinjé j. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus.  
J. Clin. Microbiol 2015;53(2):373-81