

## RIDA®GENE Bacterial Stool Panel

**REF** PG2405



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®GENE Bacterial Stool Panel ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp., und *Yersinia enterocolitica* aus humanen Stuhlproben.

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

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Durchfallerkrankungen sind ein wichtiges Gesundheitsproblem und verursachen weltweit ca. 2 Milliarden Fälle pro Jahr. Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind Durchfallerkrankungen die zweithäufigste Ursache von Todesfällen bei Kindern unter 5 Jahren weltweit, insbesondere in den Entwicklungsländern. Jedes Jahr sterben etwa 1,9 Millionen Kinder unter 5 Jahren an Durchfall, mehr als an AIDS, Malaria und Masern zusammen.<sup>1,2</sup> Häufige Ursachen einer bakteriellen Durchfallerkrankung sind *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Y. enterocolitica*. *Campylobacter*-Spezies sind weltweit eine der häufigsten Ursachen einer bakteriellen Diarrhö und verantwortlich für 400 bis 500 Millionen Fälle jährlich. Die Erkrankung, die durch die Gattung *Campylobacter* verursacht wird, bezeichnet man als Campylobacteriose. Mehr als 80 % der *Campylobacter*-Infektionen werden durch *C. jejuni* verursacht. Das Centers for Disease Control and Prevention (CDC) schätzt, dass jedes Jahr mehr als 2 Millionen Fälle von Campylobacteriose in den USA auftreten. 2008 berichtete das US-amerikanische Lebensmittelqualitätsprogramm „FoodNet“ eine Inzidenz von 13 diagnostizierten Fällen pro 100.000 Personen. *C. jejuni* wurde bei 5 - 16 % der Kinder mit Durchfall in Industrieländern und bei 8 – 45 % der Kinder mit Durchfall in Entwicklungsländern nachgewiesen.<sup>4</sup> Etwa 100 Personen mit *Campylobacter*-Infektionen versterben jedes Jahr in den USA.<sup>3,4</sup> *Campylobacter*-Infektionen erfolgen über kontaminierte Lebensmittel, insbesondere Geflügelfleisch, kontaminiertes Trinkwasser, durch Kontakt mit infizierten Tieren oder auf fäkal-oralem Weg bei Kindern. Die infektiöse Dosis ist mit 500 Bakterien relativ gering. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 5 Tagen kommt es bei Personen, die an Campylobacteriose erkranken, zu Fieber, Durchfall, Bauchkrämpfen, Erbrechen, Bauchschmerzen und Übelkeit. Als seltene langfristige Komplikationen können Autoimmunerkrankungen auftreten, zum Beispiel das Guillain-Barré-Syndrom.<sup>4</sup> *Salmonella*-Spezies sind ebenfalls eine der Hauptursachen einer bakteriellen Gastroenteritis weltweit. Derzeit sind mehr als 2.500 *Salmonella*-Serotypen beschrieben, die eine Gattung mit den beiden Arten *S. enterica* und *S. bongori* bilden und humanpathogen sind. Salmonellen verursachen Salmonellose oder Typhus. Jedes Jahr treten weltweit schätzungsweise 93,8 Millionen Fälle von Salmonellose mit 155.000 Todesfällen auf.<sup>6</sup> Das CDC schätzt, dass jedes Jahr in den USA mehr als 1,2 Millionen Fälle von Salmonellose mit mehr als 23.000 Krankenhauseinweisungen und 450 Todesfällen auftreten, sowie mehr als 1.800

Fälle von Typhus.<sup>5</sup> Die meisten der Salmonellose-Infektionen werden durch *S. typhimurium* und *S. enteritidis* verursacht, während Typhus durch *S. typhi* und *S. paratyphi* A, B oder C verursacht wird. Die Übertragung von Salmonellen erfolgt durch kontaminierte Lebensmittel, kontaminiertes Wasser oder durch Kontakt mit infizierten Tieren. Die infektiöse Dosis von Salmonellen variiert von 1 bis 1000 Bakterien. Eine Salmonellose tritt nach einer Inkubationszeit von 6 – 72 h mit klinischen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Bauchkrämpfe, Durchfall, Fieber und Kopfschmerzen auf. Bei Personen, die an Typhus erkranken, kommt es innerhalb 1 bis 3 Wochen nach Kontakt mit dem Organismus zu Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, hohem Fieber (ab 39°C bis 41°C) und gastrointestinalen Symptomen, einschließlich Bauchschmerzen und Durchfall.<sup>3,7</sup>

*Yersinia enterocolitica* ist eine von drei *Yersinia* Arten (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) der Gattung *Yersinia*, die für den Menschen pathogen sind und die intestinale Yersiniose verursachen. Das US-amerikanische Lebensmittelqualitätsprogramm „FoodNet“ berichtet für die USA eine Inzidenz von einem diagnostizierten Fall pro 100.000 Personen jährlich. Das Europäische Centre for Disease Prevention and Control berichtete 8.874 Fälle von Yersiniose im Jahr 2007, von denen etwa 5000 Fälle aus Deutschland stammten. Eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica* erfolgt durch kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser. Die geschätzte Infektionsdosis liegt bei 10<sup>4</sup> bis 10<sup>6</sup> Bakterien. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 11 Tagen kommt es bei Personen, die an einer Yersiniose erkranken zu Durchfall, Erbrechen und Bauchschmerzen. *Y. enterocolitica* kann auch eine reaktive Arthritis verursachen.<sup>3,8</sup>

Die klassische Methode für die Labordiagnose von bakteriellen gastrointestinalen Erregern ist der kulturelle Nachweis, der mehrere Tage erfordert.

### 3. Testprinzip

RIDA®GENE Bacterial Stool Panel ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. und *Yersinia enterocolitica* in humanen Stuhlproben. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente für *Campylobacter* spp. (16S rDNA), *Salmonella* spp. (ttr) und *Yersinia enterocolitica* (ystA/ystB) amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen von *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Y. enterocolitica* 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 Bacterial Stool Panel 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	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
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 ungeöffnet 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 Bacterial Stool Panel multiplex real-time 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	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
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-freies Wasser)

## 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-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. z.B. RIDA®Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® 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®GENE Bacterial Stool Panel Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden.

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

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** 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 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**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control DNA** 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 (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	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 (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	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 DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.**

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

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

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum 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 PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

## 9.3 Geräteeinstellungen

### 9.3.1 DNA real-time PCR-Profil

**Tab. 5:** DNA real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie, Rotor-Gene Q und **RIDA®CYCLER**

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 selben Schritt statt.

**Tab. 6:** DNA real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500 und CFX96™

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.

### 9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

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

**Tab. 7:** Universal real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie und RIDA®CYCLER

<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 selben Schritt statt.

**Tab. 8:** Universal real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500, 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.

## 9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Green	-
	ICD	Yellow	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Red	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
<b>Roche LightCycler® 480 z</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICD	540/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	540/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	610/670	
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none</b>
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>ABI 7500</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none</b>
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Green	<b>Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein</b>
	ICD	Yellow	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	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. 10, 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. 10:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA *1	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

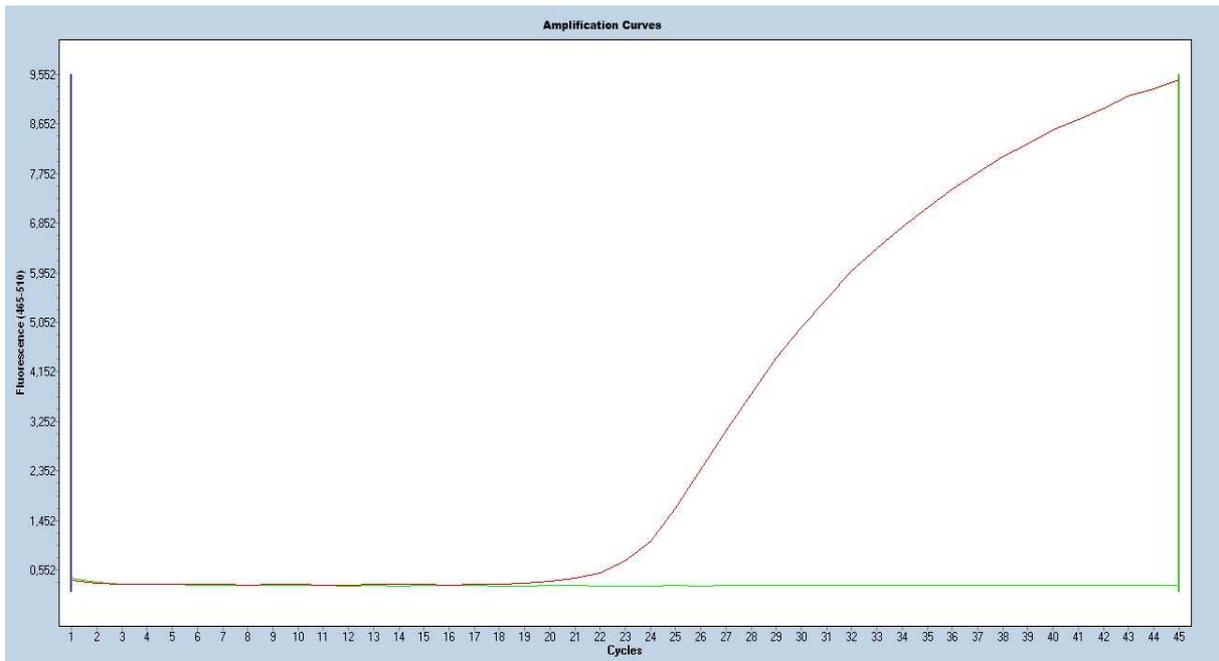
*\*1 Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

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

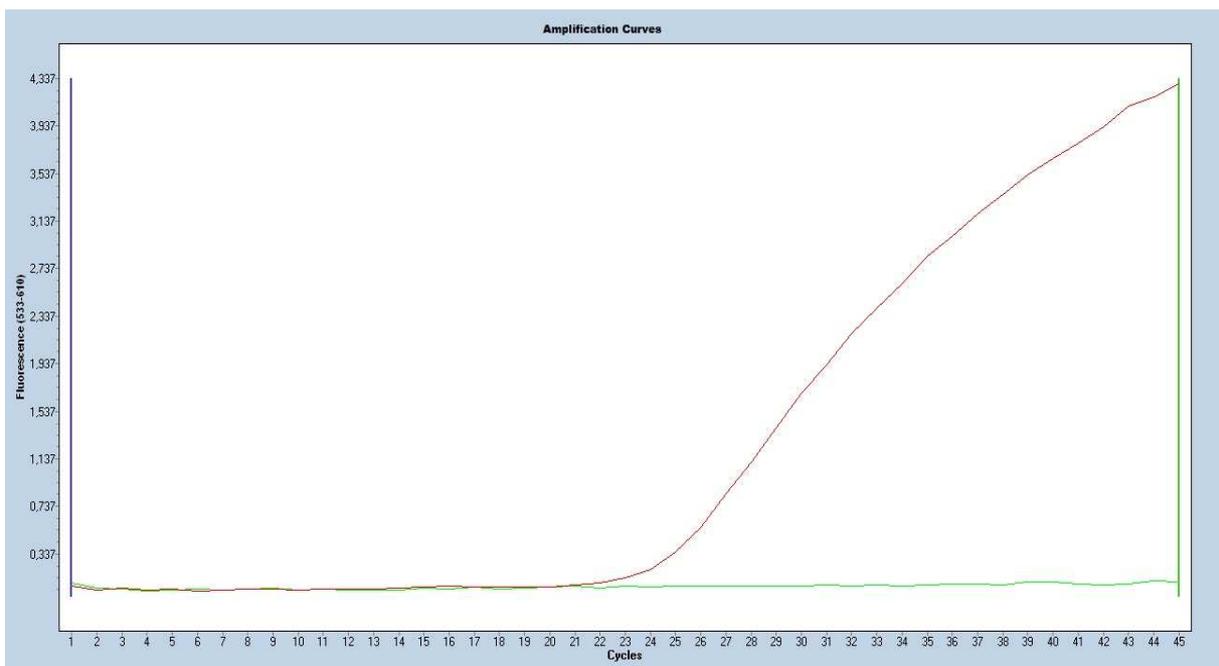
Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

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

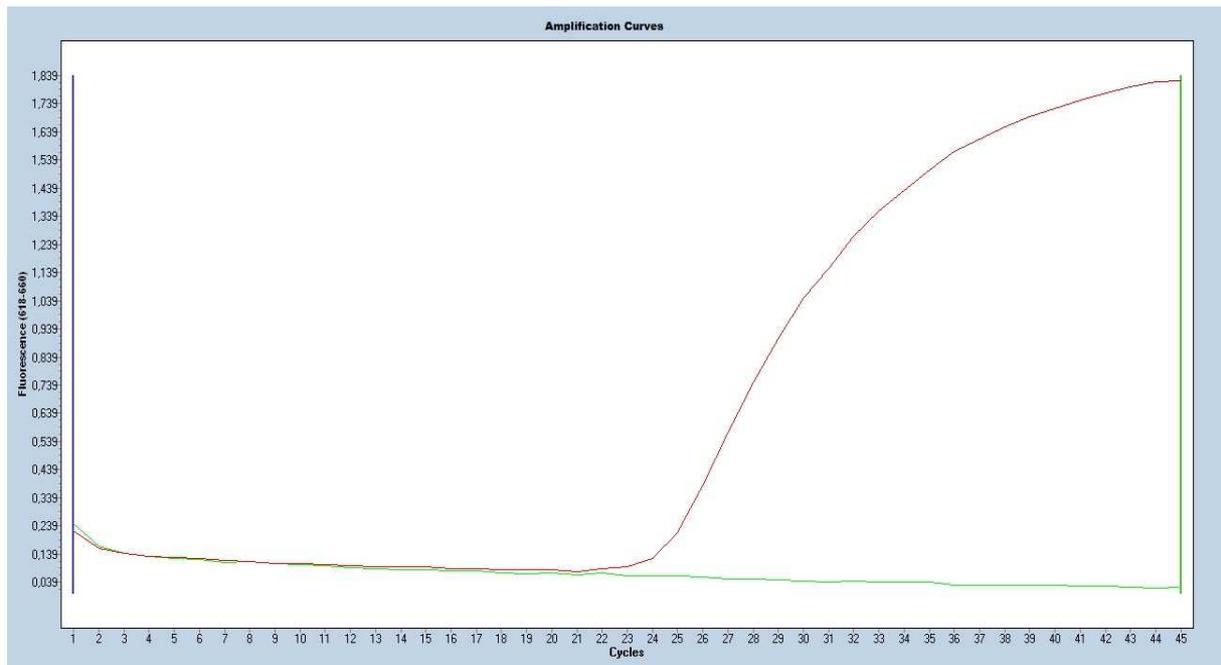
- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb. 1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Salmonella* spp.) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 2:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Yersinia enterocolitica*) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 3:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Campylobacter* spp.) auf dem LightCycler® 480II

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

**Tab. 11:** Probenauswertung

Nachweis von			ICD	Ergebnis
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.		
positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	<i>Salmonella</i> spp. nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/ negativ	<i>Yersinia enterocolitica</i> nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/ negativ	<i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/ negativ	<i>Salmonella</i> spp. und <i>Yersinia enterocolitica</i> nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/ negativ	<i>Salmonella</i> spp. und <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/ negativ	<i>Yersinia enterocolitica</i> und <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/ negativ	<i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> und <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	negativ	Positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Probe eine Amplifikation im Nachweissystem und in der dazugehörigen **Internal Control DNA** zeigt.

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

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Probe keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige **Internal Control DNA** positiv ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion bzw. ein Fehler im Extraktionsverfahren kann durch die Detektion der **Internal Control DNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist nicht auswertbar, wenn die Probe und die **Internal Control DNA** im Nachweissystem keine Amplifikation 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 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 Bacterial 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 (*Salmonella* spp. (ttr), *Yersinia enterocolitica* (ystA/ystB), *Campylobacter* spp. (16S rDNA nur *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)) vorhanden sind.
8. Mucin, Azithromycin und Stearin/Palmitinsäure können bereits in geringen Mengen interferierende Eigenschaften aufweisen.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 282 extrahierte Stuhlproben mit dem RIDA®GENE Bacterial Stool Panel Test und einer in-house real-time PCR in einem Labor in den Niederlanden untersucht.

**Tab. 12:** Korrelation der *Salmonella* spp. Ergebnisse mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positiv	50	0	50	Pos. Übereinstimmung: 100 %
	Negativ	0	232	232	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	50	232	282	

**Tab. 13:** Korrelation der *Yersinia enterocolitica* Ergebnisse mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positiv	33	0	33	Pos. Übereinstimmung: 77 %
	Negativ	10	239	249	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	43	239	282	

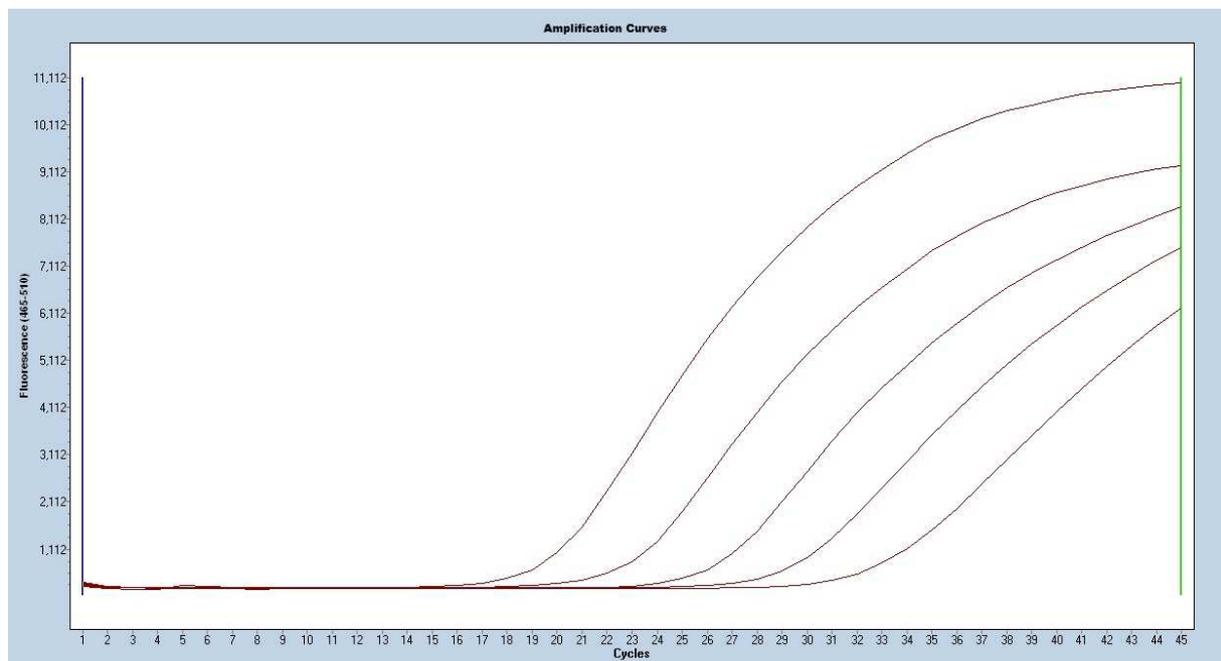
**Tab. 14:** Korrelation der *Campylobacter* spp. Ergebnisse mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positiv	41	1	42	Pos. Übereinstimmung: 82 %
	Negativ	9	231	240	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	50	232	282	

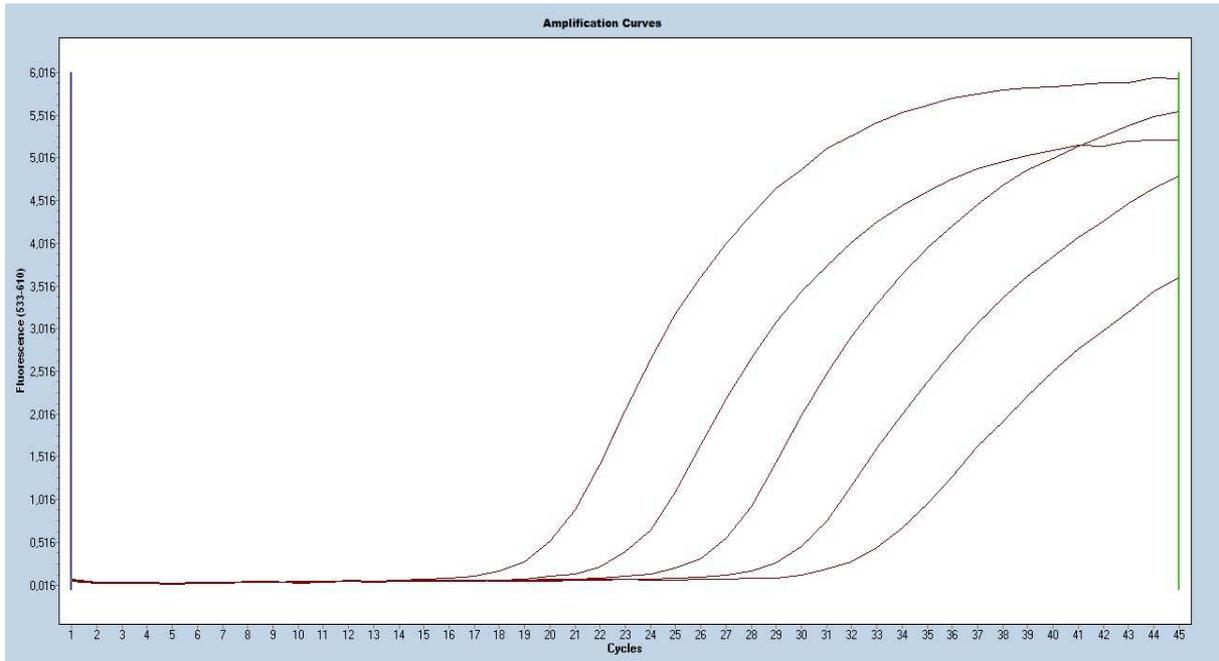
### 13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 10$  DNA-Kopien/Reaktion für *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Yersinia enterocolitica*.

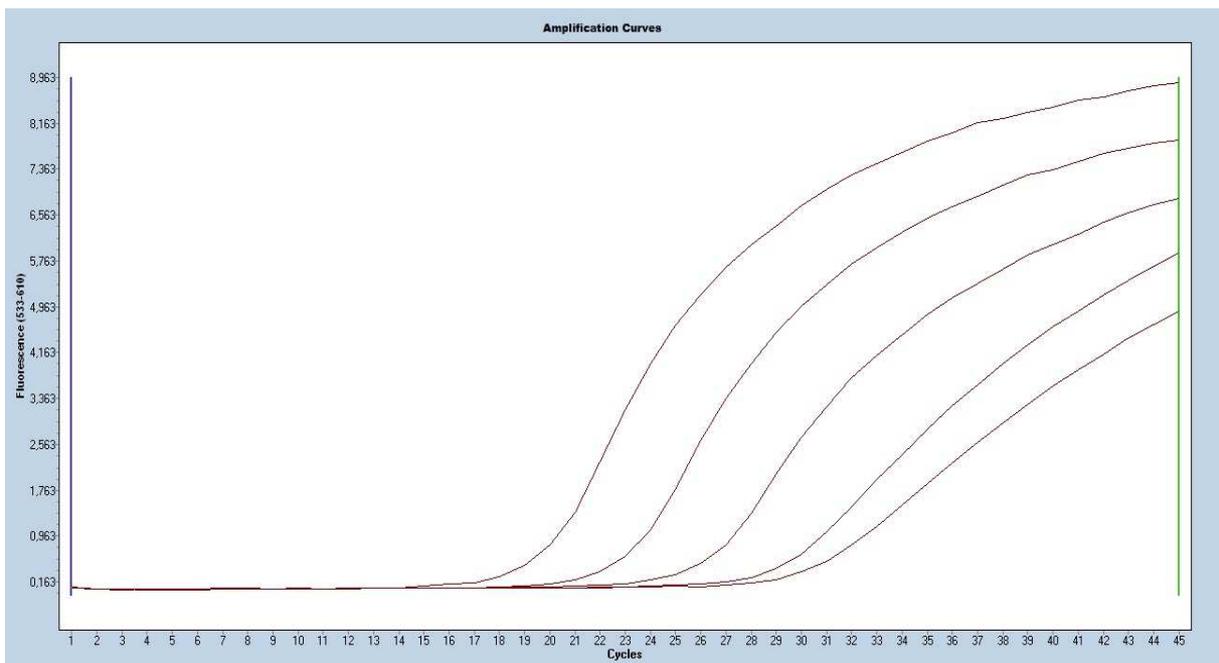
Die folgenden Abbildungen 4, 5, 6 und 7 zeigen Verdünnungsreihen von *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Yersinia enterocolitica* (jeweils  $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler® 480II.



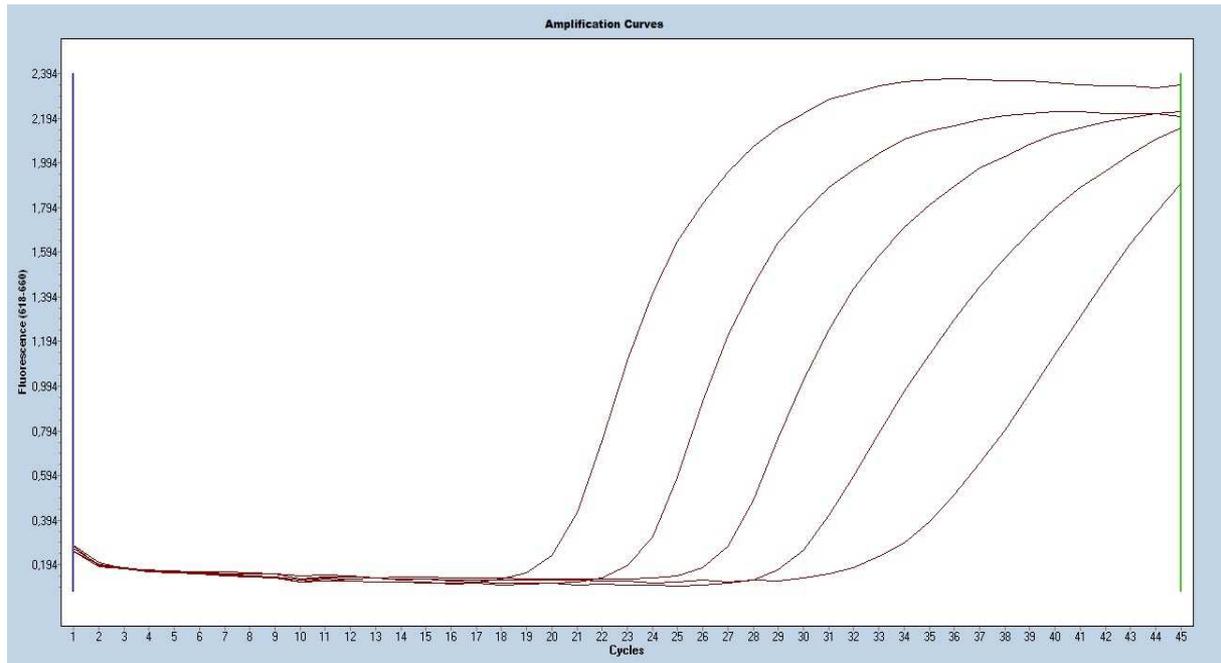
**Abb. 4:** Verdünnungsreihe *Salmonella* spp. ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 5:** Verdünnungsreihe *Yersinia enterocolitica* (*ystA*) ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) dem LightCycler® 480II



**Abb. 6:** Verdünnungsreihe *Yersinia enterocolitica* (*ystB*) ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) dem LightCycler® 480II



**Abb. 7:** Verdünnungsreihe *Campylobacter* spp. ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l)  
demLightCycler® 480II

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

### 13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* und *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*). Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 15):

**Tab. 15:** Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 40	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia frederiksenii</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia kristensenii</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG II	-	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia rohdei</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Yersinia ruckeri</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rotavirus, strain Wa	-		

### 13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen *Salmonella*-Serotypen, *Campylobacter*-Spezies und *Yersinia enterocolitica* untersucht (s. Tab. 16). Alle *Salmonella*-Serotypen, *Campylobacter*-Spezies und *Yersinia enterocolitica* des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR nachgewiesen.

**Tab.16:**Analytische Reaktivitätstestung

<b>Salmonella-Serotypen</b>					
<i>S. abony</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<i>S. paratyphi B</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<i>S. paratyphi C</i>	+
<i>S. Bareilly</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. choleraesuis</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. typhi</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. newport</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. Dublin</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+		
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. ohio</i>	+		
<b>Yersinia-Spezies</b>					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y. enterocolitica</i> subsp. <i>palaearctica</i>	+		
<b>Campylobacter - Subspezies</b>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. lari</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-06-20	Vorversion
2020-01-06	Generelle Überarbeitung 1. Zweckbestimmung 3. Testprinzip 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9.3 Geräteeinstellungen 9.4 Detektionskanaleinstellung 10. Qualitätskontrolle 12. Grenzen der Methode 13. Leistungsmerkmale

## 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. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrhea in adults and children: a global perspective.
2. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook 2012.
4. Ruiz-Palacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:701–703.
5. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
6. Majowicz SE *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:882–889.
7. Pui CF *et al.* *Salmonella*: A foodborne pathogen. Review Article. *International Food Research Journal* 2011; 18: 465-473.
8. Rosner BM *et al.* Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health* 2010; 10:337.