

RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I

REF PG2415



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Bacterial Stool Panel I ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. und *Campylobacter* spp. aus humanen Stuhlproben.

Die RIDA®GENE Bacterial Stool Panel I 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.^{1,2} Häufige Ursachen einer bakteriellen Durchfallerkrankung sind *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Shigella* spp. *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 bis 16 % der Kinder mit Durchfall in Industrieländern und bei 8 - 45% der Kinder mit Durchfall in Entwicklungsländern nachgewiesen.⁴ Etwa 100 Personen mit *Campylobacter*-Infektionen versterben jedes Jahr in den USA.^{3,4} *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.⁴ *Salmonella*-Spezies sind auch 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.⁶ 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.⁵ 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.^{3,7}

Einer der 6 bekannten darmpathogenen *E. coli* ist der enteroinvasive *E. coli* (EIEC). EIEC verursachen in Entwicklungsländern, aber auch bei Reisenden in diese Länder eine Shigellose-ähnliche Erkrankung, da sie biochemisch und genetisch sehr eng mit *Shigella* spp. verwandt sind. Die Pathogenität von EIEC und auch *Shigella* spp. beruht auf der plasmidvermittelten Fähigkeit in Colonepithelzellen einzudringen und diese zu zerstören.

Durch den Nachweis des ipaH Gens (invasion plasmid antigen H Gen) können EIEC/*Shigella* spp. gegen ETEC abgegrenzt werden.

Die klinischen Symptome der durch EIEC verursachten Shigellose sind charakterisiert durch anhaltende Bauchkrämpfe mit wässrigem, eventuell blutigem Durchfall. Infektionsquellen sind hauptsächlich kontaminiertes Wasser und Nahrungsmittel, aber auch Infektionsketten von Mensch zu Mensch sind von Bedeutung.

Neben EIEC/*Shigella* spp. haben die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) besondere Bedeutung erlangt. Jedes Jahr werden in Deutschland ca. 1000 EHEC-Erkrankungen gemeldet.

EHEC sind eine Untergruppe der Shiga-Toxin bzw. Vero-Toxin bildenden *E. coli* (STEC bzw. VTEC) und haben die Fähigkeit zur Bildung zweier Zytotoxine, Vero-Toxin 1 und 2. Wegen der Ähnlichkeit der Verotoxine zum Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* werden die VTEC synonym auch als STEC bezeichnet.

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

Die RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel I multiplex real-time PCR ist eine attraktive Alternativmethode zur Untersuchung von Stuhlproben und hat sich als hoch sensitiv und spezifisch für den gleichzeitigen Nachweis der vier wichtigsten Durchfall verursachenden Bakterien (STEC, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und EIEC/*Shigella* spp.) erwiesen.

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel I ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von STEC, *Salmonella* spp.,

Campylobacter spp. und EIEC/*Shigella* spp. in humanen Stuhlproben. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente für STEC (stx1/2), *Salmonella* spp. (ttr), *Campylobacter* spp. (16s-rDNA) und EIEC/*Shigella* spp. (ipaH) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen von STEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und EIEC/*Shigella* spp. 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 I 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 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 Bacterial Stool Panel I 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-Gerät:	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P (mit ATTO-Filter)

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 IV (PG0004) 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
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, 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 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 Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Präparation aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (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 I 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 als 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 No Template Control 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	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

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	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 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 **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und die Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der No Template Control 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 **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und die 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 abzentrifugieren 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: Real-time PCR Profil für LightCycler® 480II

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: Annealing und Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Real-time PCR Profil für Mx3005P

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: Annealing und 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® 480II

<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: Annealing und Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 8: Universal real-time PCR profile for Mx3005P

<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: Annealing und Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	STEC	440/488	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	
	ICD	533/580	
	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	STEC	ATTO	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	
	ICD	HEX	
	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	

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, Abb. 4).

Die **Positive Control** liegt für STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. und *Campylobacter* spp. 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.

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	0

^{*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 Kontrolle 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

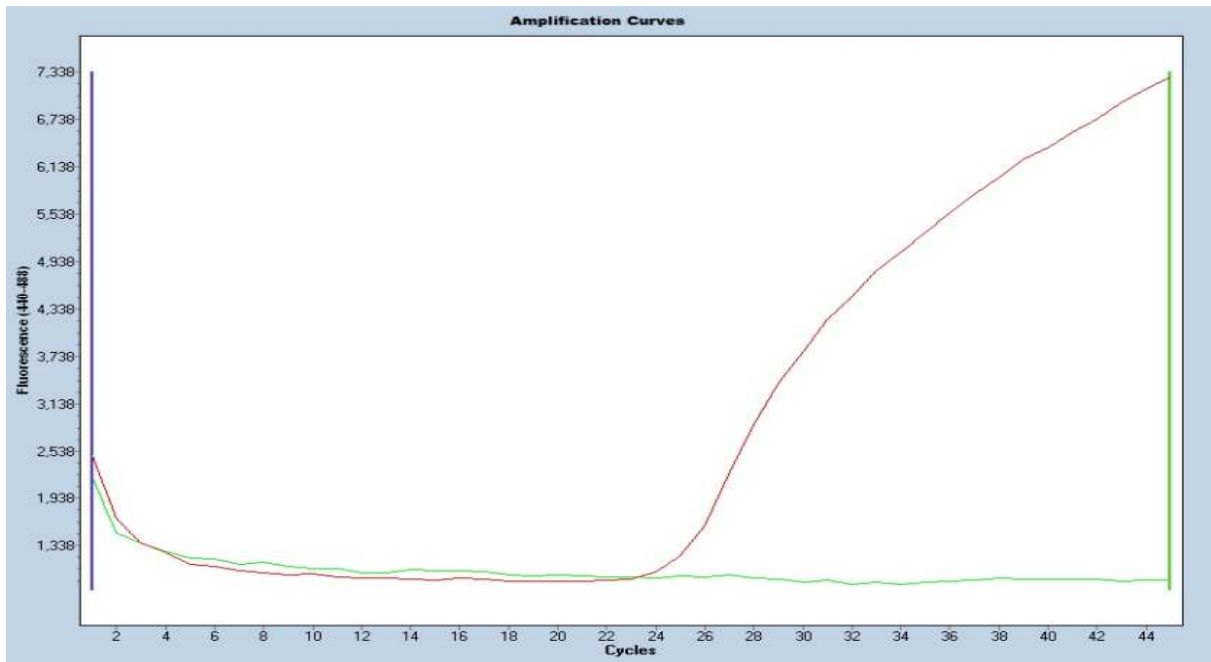


Abb.1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*STEC*) auf dem LightCycler® 480II

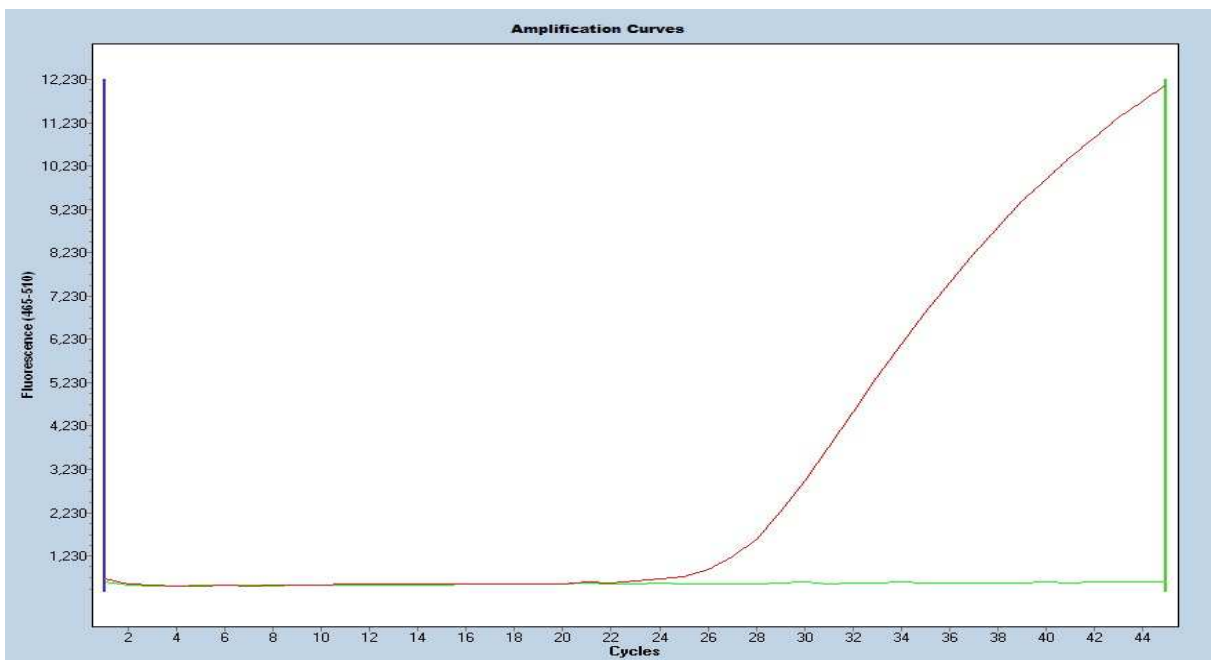


Abb.2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Salmonella* spp.) auf dem LightCycler® 480II

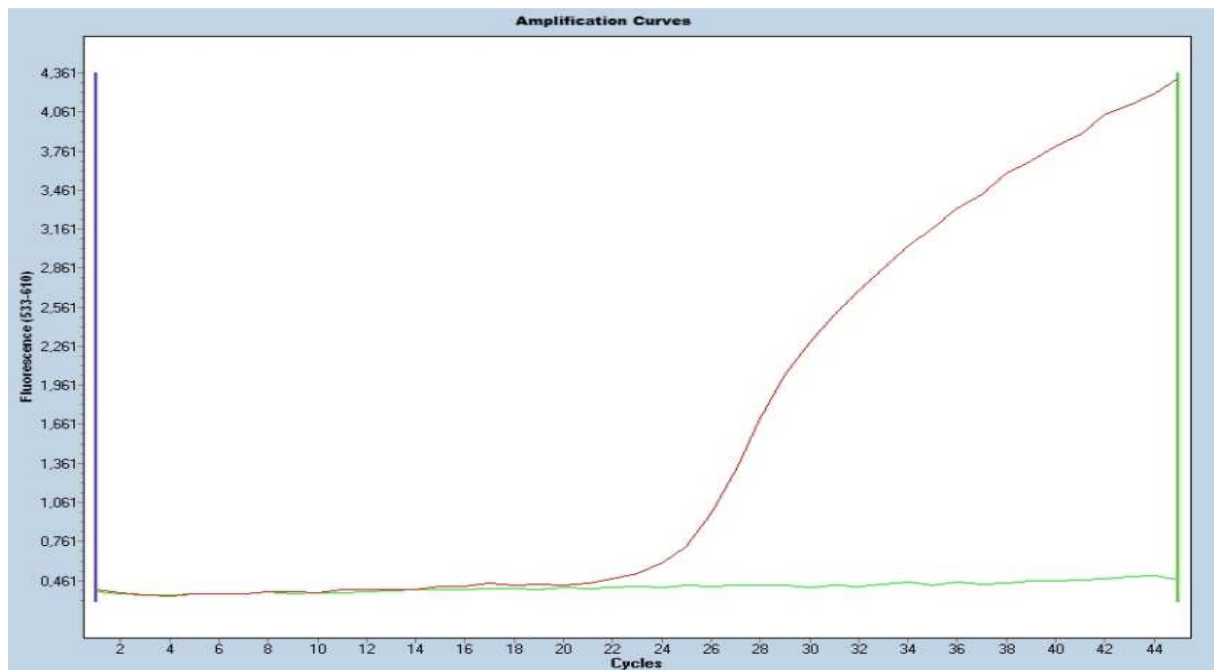


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*EIEC/Shigella* spp.) auf dem LightCycler® 480II

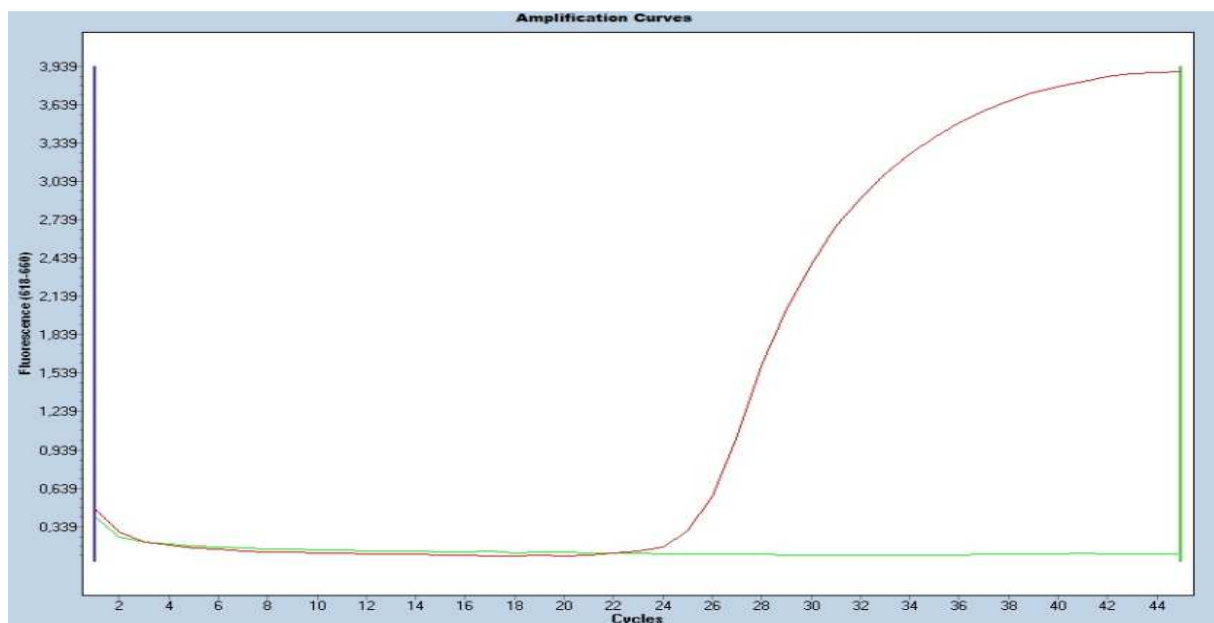


Abb. 4: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Campylobacter* spp.) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Probenauswertung

Zielgene					
STEC	<i>Salmonella</i> spp.	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.	ICD	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	negativ	positiv/negativ	STEC nachweisbar
negativ	positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>Salmonella</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
positiv	positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	STEC, <i>Salmonella</i> spp. nachweisbar
positiv	negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	STEC, EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
positiv	negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	STEC, <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
positiv	positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	STEC, <i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	STEC, EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	STEC, <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
negativ	positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	STEC, <i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

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

Eine Probe wird 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 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 I 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 (stx1/2, ttr, 16s-rDNA, ipaH) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®] GENE Bacterial Stool Panel I multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien / Reaktion für STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. und *Campylobacter* spp..

Die folgenden Abbildungen 5, 6, 7 und 8 zeigen Verdünnungsreihen von STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. und *Campylobacter* spp. (jeweils $10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II.

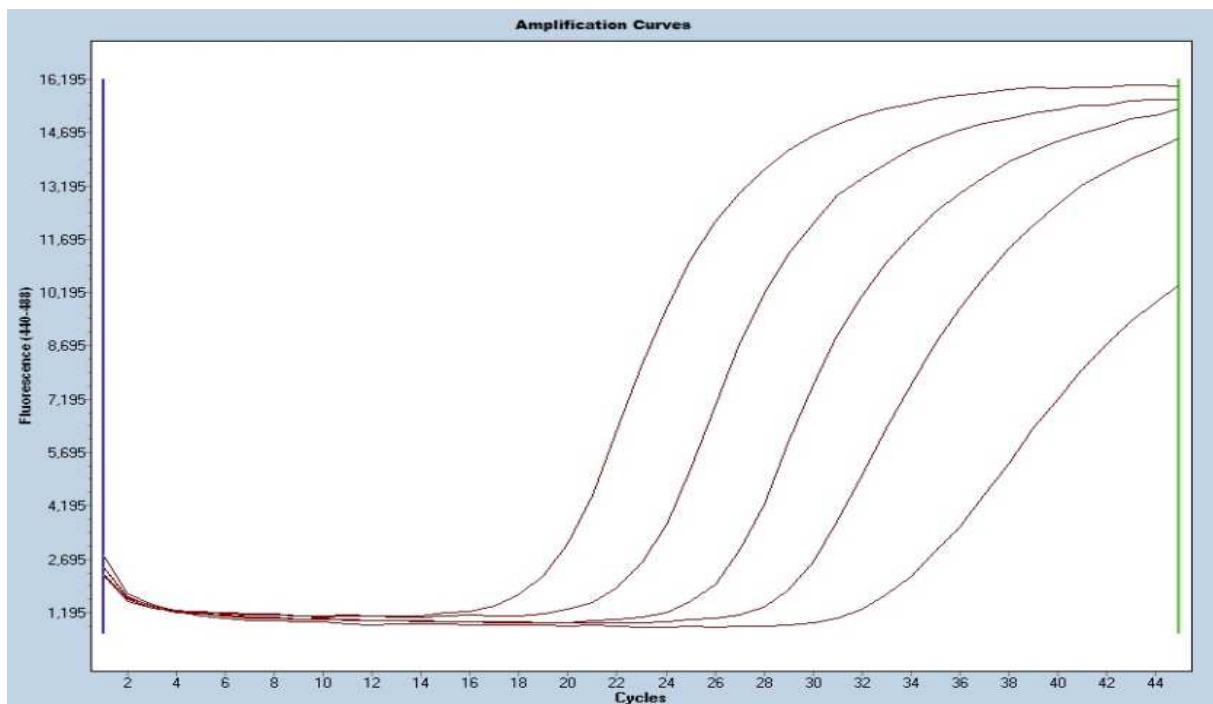


Abb.5: Verdünnungsreihe STEC ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

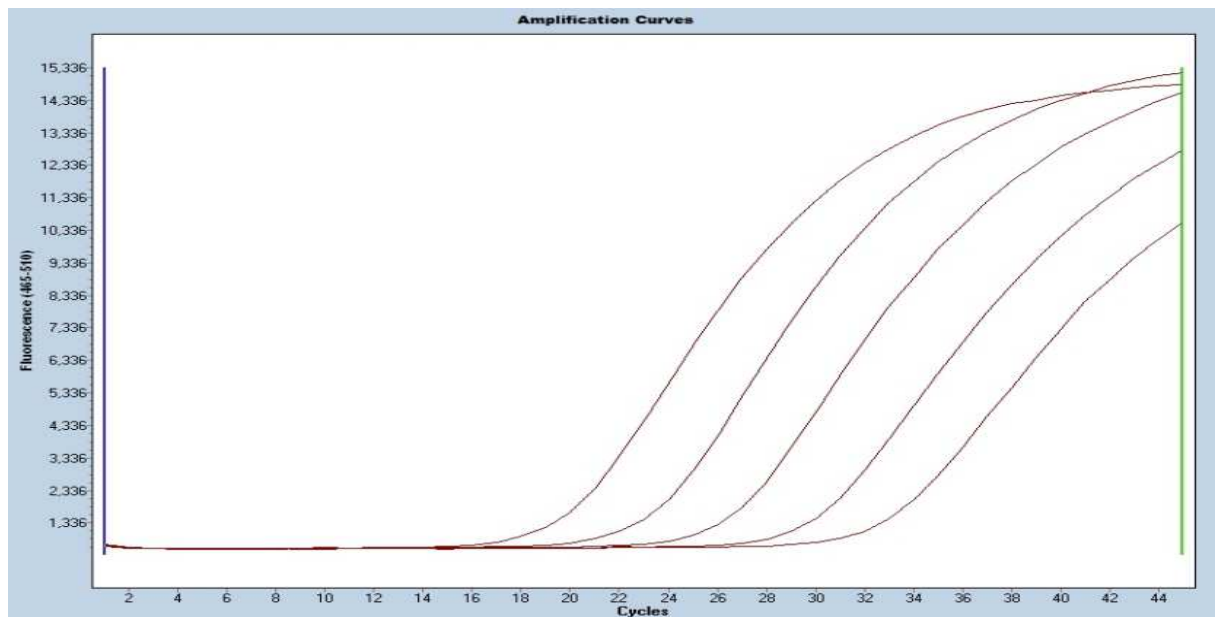


Abb.6: Verdünnungsreihe *Salmonella* spp. (10^5 - 10^1 DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

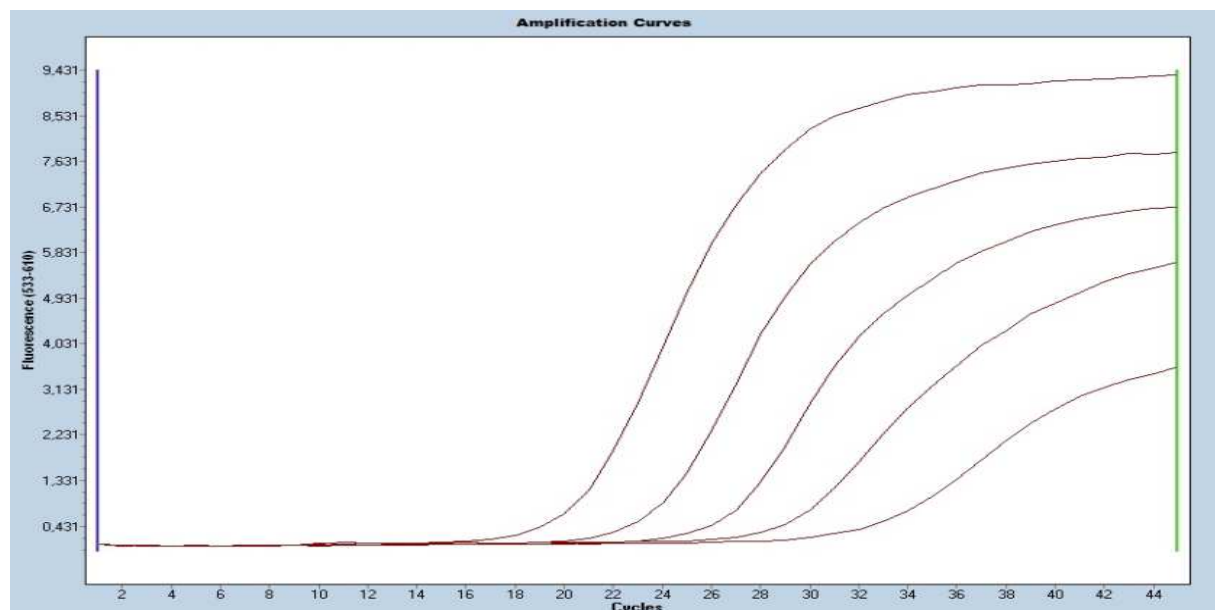


Abb.7: Verdünnungsreihe EIEC/*Shigella* spp. (10^5 - 10^1 DNA Kopien/ μ l) dem LightCycler[®] 480II

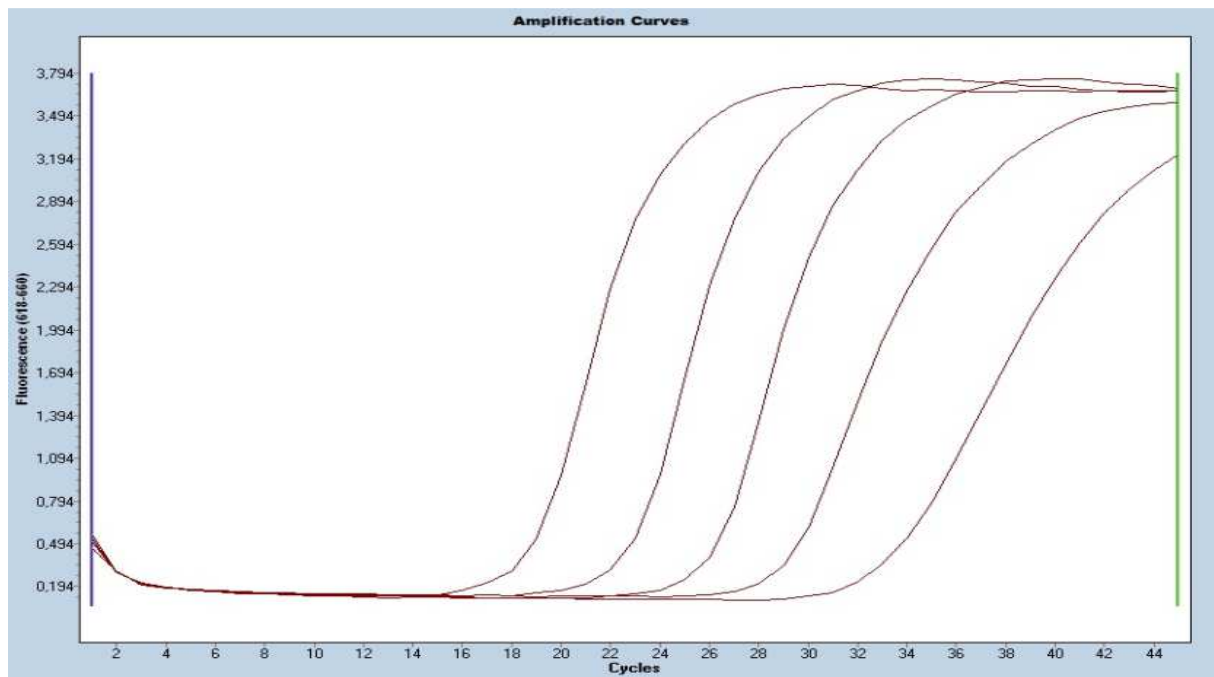


Abb.8: Verdünnungsreihe *Campylobacter* spp. (10^5 - 10^1 DNA Kopien / μ l) dem LightCycler® 480II

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

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I multiplex real-time PCR ist spezifisch für STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. und *Campylobacter* spp. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

Tab. 12: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG I	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG II	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
Campylobacter fetus subsp. fetus	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Campylobacter upsaliensis	-						

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel I multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen STEC-Subtypen, *Campylobacter*-Spezies, *Salmonella*-Serotypen und EIEC/*Shigella* spp. untersucht (s. Tab. 13).

Alle STEC-Subtypen, *Campylobacter*-Spezies, *Salmonella*-Serotypen und EIEC/*Shigella* spp. des Probenpanels wurden mit der RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel I multiplex real-time PCR nachgewiesen.

Tab.13: Analytische Reaktivitätstestung










stx1-Subtypen					
stx1a	+	stx1c	+	stx1d	+
stx2-Subtypen					
stx2a	+	stx2d	+	stx2g	+
stx2b	+	stx2e	+		
stx2c	+	stx2f	+		
Campylobacter-Spezies					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+	<i>C. lari</i>	+
Salmonella-Serotypen					
<i>S. augustinbourg</i>	+	<i>S. ealing</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+
<i>S. abony</i>	+	<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. newport</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. essen</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+
<i>S. amsterdam</i>	+	<i>S. glostrup</i>	+	<i>S. ohio</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. gloucester</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. goldcoast</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. bareilly</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. poona</i>	+
<i>S. berta</i>	+	<i>S. haifa</i>	+	<i>S. pullorum</i>	+
<i>S. blegdam</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. rostock</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bovismorbificans</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. brandenburg</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. senftenberg</i>	+
<i>S. caracas</i>	+	<i>S. kentucky</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. chloeraesius</i>	+	<i>S. kiel</i>	+	<i>S. virchow</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. livingston</i>	+	<i>S. wernigerode</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. wilhelmsburg</i>	+
<i>S. dublin</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. duesseldorf</i>	+	<i>S. moscow</i>	+		
Shigella					
<i>S. boydii</i>	+	<i>S. dysenteriae</i>	+	<i>S. flexneri</i>	+
<i>S. sonnei</i>	+				

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2015-06-15	Freigabeversion
2018-06-06	Generelle Überarbeitung
2018-06-06	4. Packungsinhalt 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 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. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrheain adults and children : a global perspective.
2. UNICEF/WHO, Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA 2012. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook.
4. Ruiz-Palacios GM. 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. Clinical Infectious Diseases 2010; 50:882–889.
7. Pui CF et al. International Food Research Journal 2011; 18: 465-473.