

RIDA® GENE Viral Stool Panel I

REF PG1315



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Viral Stool Panel I ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Norovirus, Rotavirus, Adenovirus 40/41, und Astrovirus in humanen Stuhlproben.^{1,2,3,4} Die RIDA®GENE Viral Stool Panel I multiplex real-time RT-PCR soll die Diagnose einer durch gastrointestinale Viren verursachten Gastroenteritis unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Die akute Gastroenteritis ist weltweit eine der Hauptursachen von Morbidität und Mortalität. Enterale Viren sind vor allem bei Kindern die häufigste Ursache einer Gastroenteritis. In den Vereinigten Staaten verursachen virale Infektionen jährlich schätzungsweise 30,8 Millionen Fälle von Gastroenteritis.⁵ Die wichtigsten viralen Durchfallerreger sind Noro-, Rota-, Adeno- und Astroviren.

Noroviren gehören zur Familie der *Caliciviridae* und sind einzelsträngige RNA (ssRNA) Viren. Eine noroviral-bedingte Gastroenteritis äußert sich durch starke Übelkeit, heftiges Erbrechen und schweren Durchfall. Noroviren werden sowohl mit dem Stuhl als auch mit dem Erbrochenen ausgeschieden.⁶ 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, aus der Genogruppe II (GGII) mit 22 Genotypen und aus der Genogruppe IV (GGIV) mit 2 Genotypen beschrieben.^{7,8} Es wird geschätzt, dass in den USA jedes Jahr über 21 Millionen Fälle von akuter Gastroenteritis, 70.000 Krankenhausaufenthalte und 800 Todesfälle durch Noroviren verursacht werden.⁶

Rotaviren gehören zur Familie der *Reoviridae*. Es handelt sich dabei um unbehüllte ikosaedrische doppelsträngige RNA (dsRNA) Viren. 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 Diarrhoe und weltweit verantwortlich für den Tod von schätzungsweise 611.000 Kindern jährlich.⁹ Rotaviren werden in 7 Serogruppen A – G unterteilt, wobei die Erreger der Serogruppe A die größte epidemiologische Bedeutung besitzen.¹⁰

Adenoviren sind unbehüllte ikosaedrische doppelsträngige DNA (dsDNA) Viren und gehören zur Familie der *Adenoviridae*. Man unterscheidet 56 humanpathogene Adenovirus Serotypen, die in sieben Gruppen (A - G) unterteilt werden. Adenoviren verursachen überwiegend Erkrankungen der Atemwege, während die Serotypen 40 und 41 hauptsächlich Gastroenteritiden hervorrufen.^{11,12}

Astroviren sind einzelsträngige RNA (ssRNA) Viren und gehören zur Familie der *Astroviridae*. Eine astroviral-bedingte Gastroenteritis äußert sich hauptsächlich durch Durchfall, aber auch Begleiterscheinungen wie Erbrechen und Fieber sind beschrieben. In westlichen Ländern beträgt die Astrovirus-Inzidenz 2 - 9 %, wobei eine Erkrankung vor allem bei Kindern unter zwei Jahren auftritt.¹³ Von den bis heute

8 bekannten Serotypen sind die Serotypen 1-5 besonders relevant.¹⁴ Die Infektion erfolgt über kontaminierte Lebensmittel, über Wasser und auf dem fäkal-oralen Übertragungsweg.¹⁵

3. Testprinzip

Die RIDA®GENE Viral Stool Panel I multiplex real-time RT-PCR ist eine molekular-diagnostische PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Norovirus RNA, Rotavirus RNA, Adenovirus 40/41 DNA und Astrovirus RNA 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 wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die für Norovirus (ORF1/ORF2 junction Region), Rotavirus (NSP3), Adenovirus 40/41 (Hexon) und Astrovirus (CAP; capsid protein) -spezifischen Genfragmente 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 optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE Viral Stool Panel I 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 Testeigenschaften 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 Viral Stool Panel I 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	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P

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 (Roche)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße
- 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 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.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA/RNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-/RNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) für Stuhlproben empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:10 mit PCR-Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 1 min bei 13.000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®]GENE Viral Stool Panel I 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 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
	Gesamt	20 µl	220 µl

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
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

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 RNA-Extrakt 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® 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: Das Annealing und die Extension finden im Schritt statt.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR Profil für 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: 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	Adenovirus	440/488	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	Norovirus	465/510	
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	Astrovirus	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	Adenovirus	ATTO	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none Die „Filter Set Gain Settings“ für ATTO müssen auf 8 eingestellt sein
	Norovirus	FAM	
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Astrovirus	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. 8, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die **Positive Control** liegt für Adenovirus 40/41, Norovirus, Rotavirus und Astrovirus 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. 8: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA *1	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

*1 Ein Ct-Wert für die ICR 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

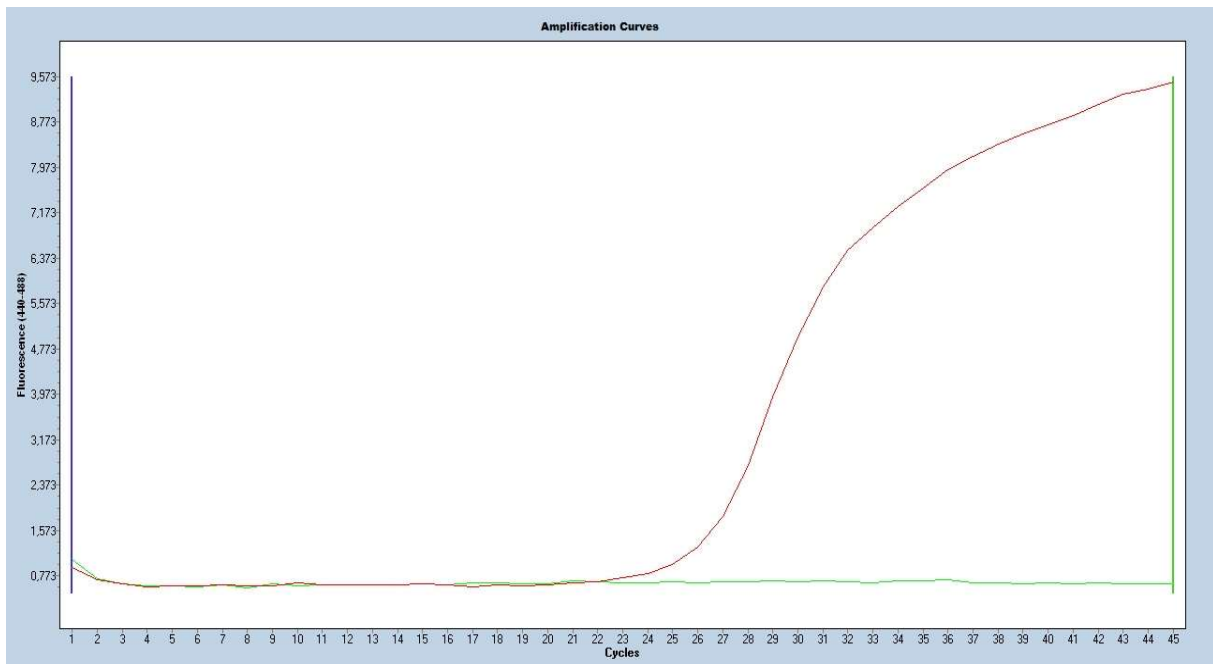


Abb.1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Adenovirus) auf dem LightCycler® 480II

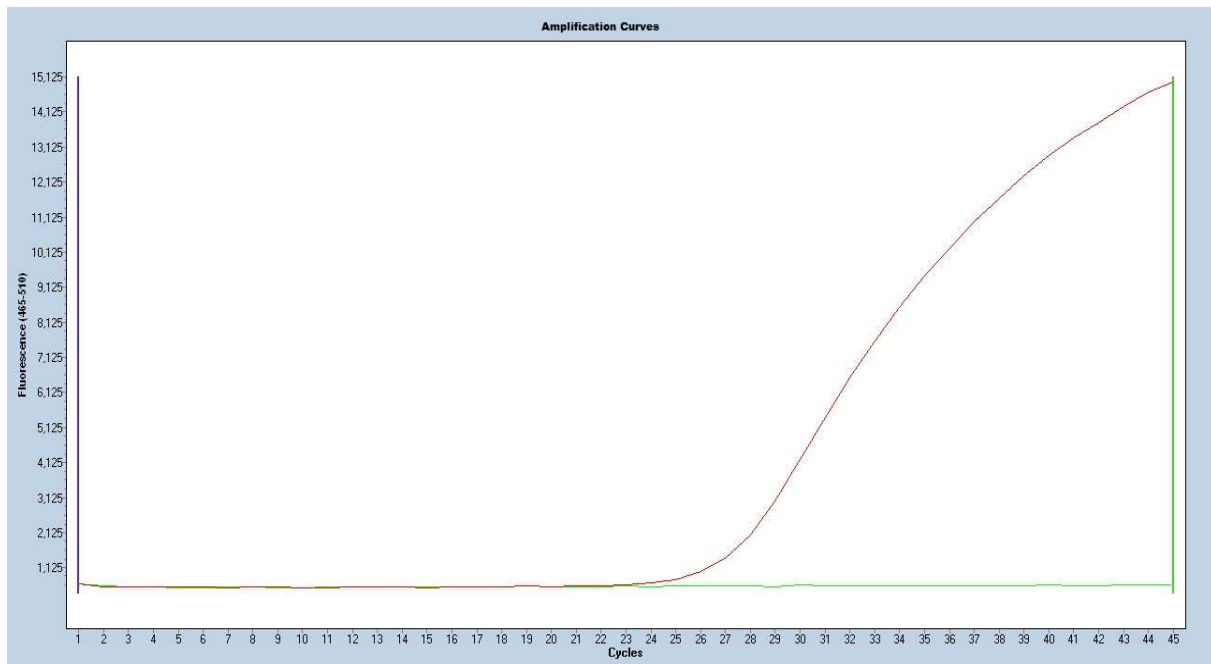


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Norovirus) auf dem LightCycler® 480II

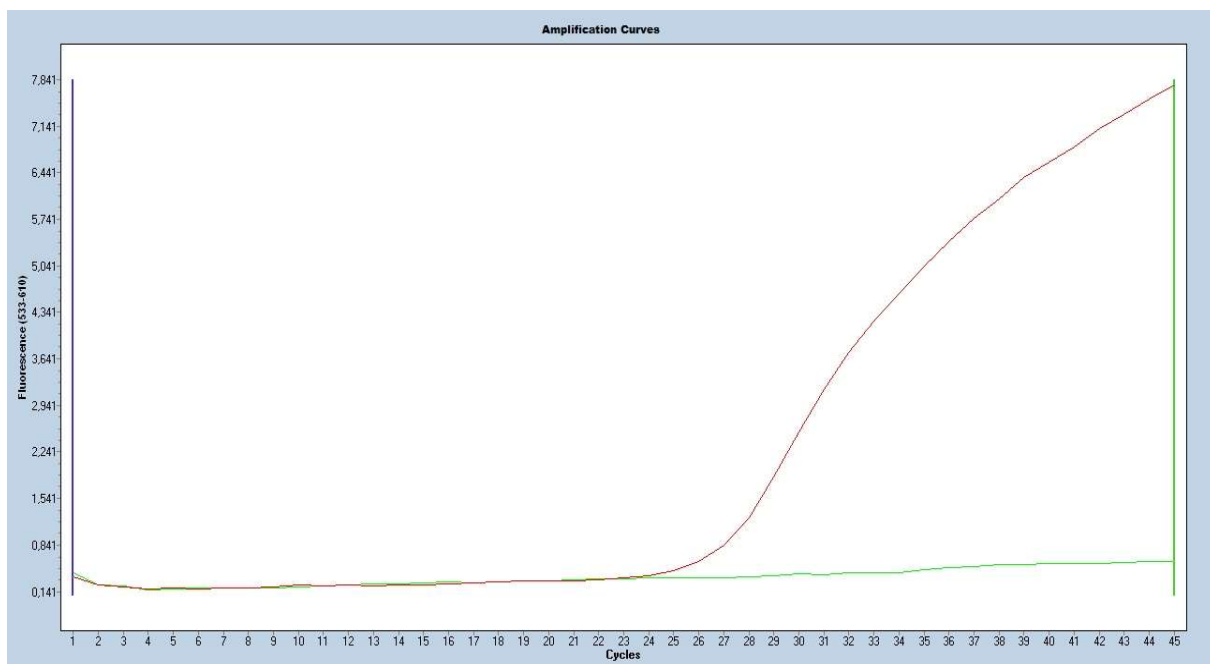


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Rotavirus) auf dem LightCycler® 480II

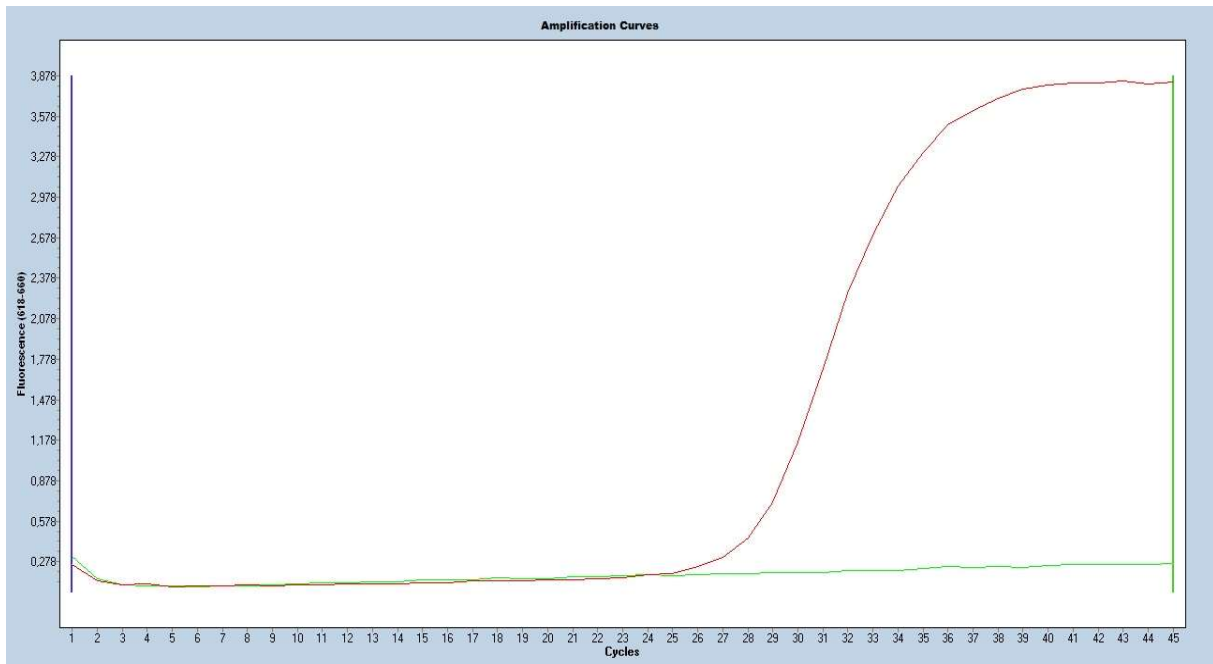


Abb.4: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Astrovirus) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Probenauswertung

Zielgene				ICR	Ergebnis
Adenovirus	Norovirus	Rotavirus	Astrovirus		
positiv	negativ	negativ	negativ	positiv/negativ	Adenovirus nachweisbar
negativ	positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	Norovirus nachweisbar
negativ	negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	Rotavirus nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	Astrovirus nachweisbar
positiv	positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	Adenovirus und Norovirus nachweisbar
positiv	negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	Adenovirus und Rotavirus nachweisbar
positiv	negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	Adenovirus und Astrovirus nachweisbar
negativ	positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	Norovirus und Rotavirus nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	Norovirus und Astrovirus nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	Rotavirus und Astrovirus nachweisbar
positiv	positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	Adenovirus, Norovirus und Rotavirus nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	Adenovirus, Norovirus und Astrovirus nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	Adenovirus, Rotavirus und Astrovirus nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	Norovirus, Rotavirus und Astrovirus nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	Adenovirus, Norovirus, Rotavirus und Astrovirus nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt und eine Amplifikation für die **Internal Control RNA** im Nachweissystem zu sehen ist.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die **Internal Control RNA** im Nachweissystem zeigt. 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-RNA keine Amplifikation, aber die **Internal Control RNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control RNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-RNA 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. Der RIDA[®]GENE Viral Stool Panel I 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 den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®]GENE Viral 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 Zielgene (Adenovirus 40/41 (Hexon), Norovirus (ORF1/ORF2 junction Region), Rotavirus (NSP3), Astrovirus (CAP; capsid protein)) vorhanden sind.
8. Noroviren der Genogruppe IV, die in sehr seltenen Fällen auch Menschen infizieren können, werden ebenfalls mit RIDA[®]GENE Viral Stool Panel I nachgewiesen.

9. Mit RIDA[®]GENE Viral Stool Panel I werden ausschließlich die Adenovirus-Serotypen 40 und 41, welche hauptsächlich Gastroenteritiden hervorrufen, nachgewiesen. Die Serotypen 1, 2, 5, 6, 12, 18, und 31, die in den seltensten Fällen Verursacher einer akuten Diarrhoe sind, werden nicht mit dem RIDA[®]GENE Viral Stool Panel I Test erfasst.
10. Mucin kann ab einer Konzentration von 2,5 % (v/v) interferierende Eigenschaften aufweisen.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®]GENE Viral Stool Panel I multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 Kopien/Reaktion.

Die folgenden Abbildungen 5, 6, 7 und 8 zeigen eine Verdünnungsreihe jeweils von Adenovirus ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) und Norovirus, Rotavirus und Astrovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II.

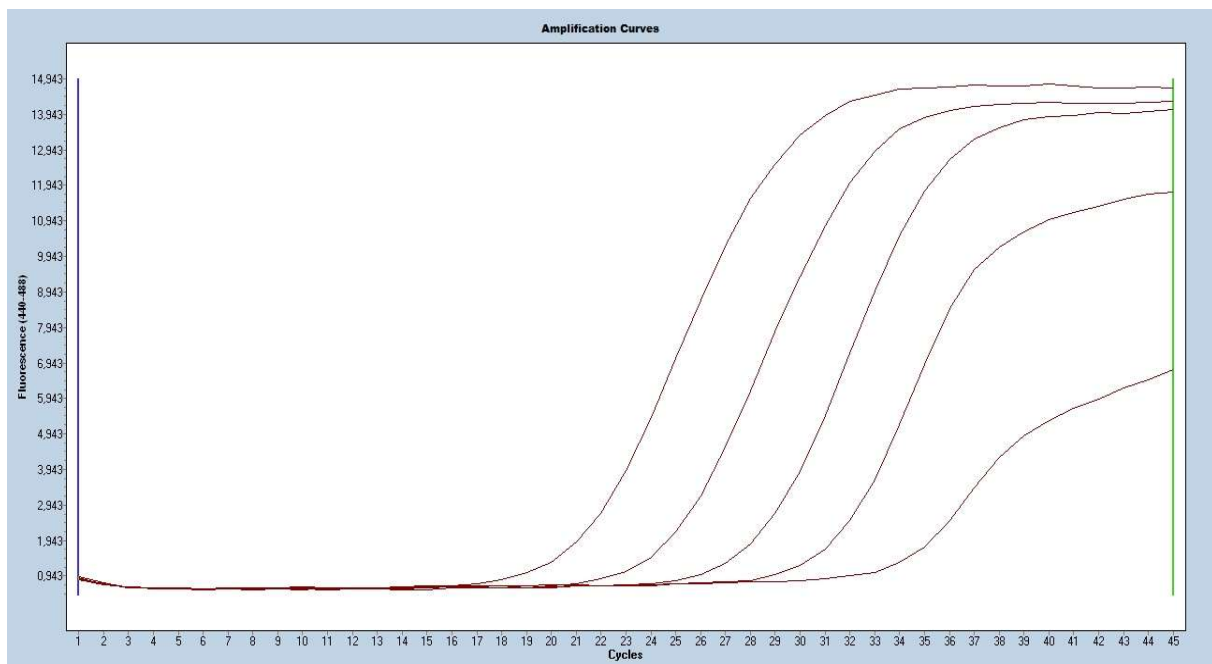


Abb. 5: Verdünnungsreihe Adenovirus ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

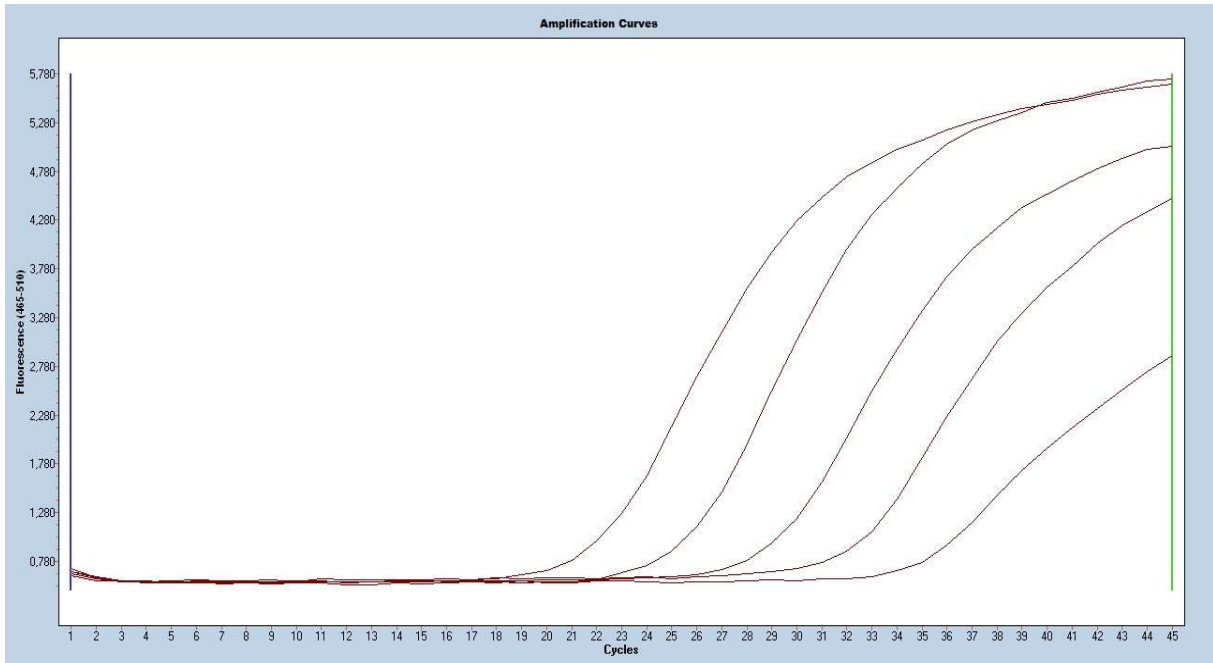


Abb. 6: Verdünnungsreihe Norovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

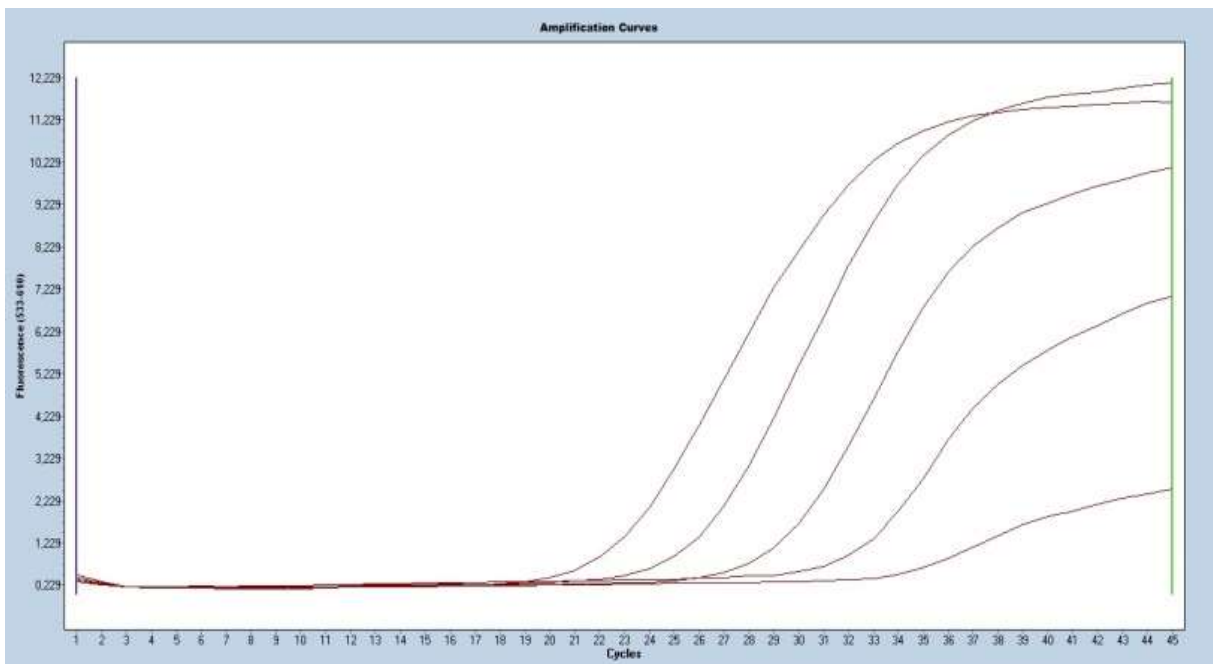


Abb. 7: Verdünnungsreihe Rotavirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

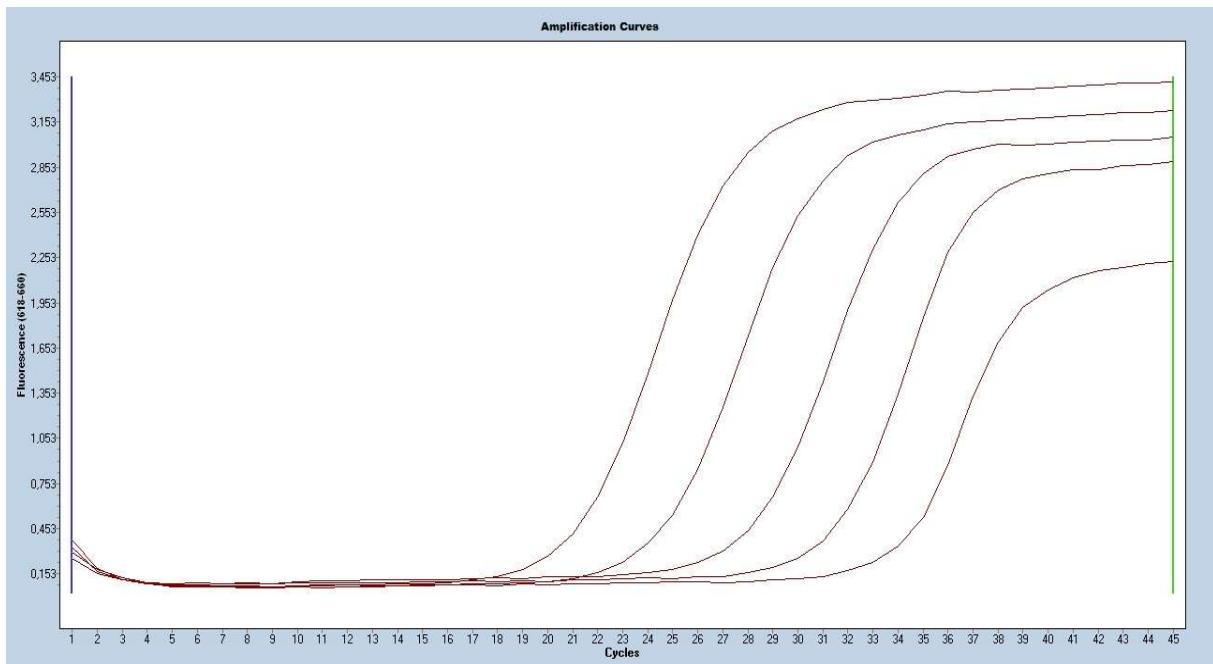


Abb. 8: Verdünnungsreihe Astrovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, DNA/RNA-Extraktion und DNA/RNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Viral Stool Panel I multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Adenovirus, Norovirus (Genogruppe I und II), Rotavirus und Astrovirus. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab.10):

Tab.10: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus type: 4	-	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus type: 5	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus type: 7A	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus type: 11	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Adenovirus type: 31	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Adenovirus type: 37	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-				

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Viral Stool Panel I multiplex real-time RT-PCR wurde mit Adenoviren, Noroviren, Rotaviren und Astroviren untersucht (s. Tab.11). Die getesteten Norovirus-Genogruppen bzw. Adenovirus-, Rotavirus-, und Astrovirus-Serotypen wurden mit der RIDA®GENE Viral Stool Panel I multiplex real-time RT-PCR und mittels Sequenzabgleich (*) nachgewiesen.

Tab. 11: Analytische Reaktivitätstestung










Adenovirus					
Serotyp 40	+	Serotyp 41	+		
Norovirus					
Genogruppe I					
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	+
Genogruppe II					
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	+		
Genogruppe IV					
GGIV.1 – Alpatron	+				
Rotavirus					
Serogruppe A					
Serotyp G1	+	Serotyp G2	+	Serotyp G3	+
Serotyp G4	+	Serotyp G9	+	Serotyp G12	+
Astrovirus					
Serotyp 1*	+	Serotyp 2	+	Serotyp 3*	+
Serotyp 4*	+	Serotyp 5*	+	Serotyp 7*	+
Serotyp 8	+				

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-06-14	Vorversion
2021-01-27	Generelle Überarbeitung 10. Qualitätskontrolle (Rechtschreibfehler) 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

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

Testspezifische Symbole

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literatur

1. Hoehne M, *et al.* Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infectious Diseases*. 2006; 6:69-75.
2. Pang XL, *et al.* Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens From Children With Diarrhea. *Journal of Medical Virology* 2004, 72: 496–501.
3. Heim A, *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003, 10: 228-239.
4. Kapoor A, *et al.* Multiple novel Astrovirus species in human stool. *Journal of general Virology* 2009, 90: 2965-2972.
5. Mead PS, *et al.* *EID* 1999, 5: 607-625.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
7. Parra GI, *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017, 13(1): e1006136.
8. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal Clinical Microbiology* 2015, 53(2):373-81.
9. Parashar UD, *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12: 304-306.
10. Robert Koch Institut. Rotaviren-Gastroenteritis. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten. Stand 31.07.2013.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Rotaviren.html;jsessionid=D381EC22661EBE5C847628E9368E3401.2_cid381#doc2374564bodyText8. Aufgerufen am 09.07.2018.
11. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitis durch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
12. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.
13. Guix S, *et al.* Human astrovirus diagnosis and typing: current and future Prospects. *Letters of Applied Microbiology* 2005, 41:103-105.
14. Wilhelmi I, *et al.* Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection* 2003, 9: 247-262.
15. Guix S, *et al.* Human Astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2014, 27:1048-1074.