

RIDA® GENE Enterovirus

REF PG4705



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Enterovirus ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Enteroviren aus humanen Stuhlproben und Liquor.¹

Die RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR soll die Diagnose einer durch Enteroviren (Polioviren, Echoviren, Coxsackieviren, humane Enteroviren 70/71) verursachten Erkrankung unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Enteroviren gehören zur Familie der *Picornaviridae* und werden nach aktueller Klassifikation in 15 Spezies (Enterovirus A-L und Rhinovirus A-C) unterteilt, wobei die Spezies Enterovirus E-L nicht als humanpathogen beschrieben sind.^{2,3,4} Zur Spezies der Enteroviren A gehören neben den humanen Enteroviren A auch die Coxsackie-Viren A, während die Spezies der Enteroviren B neben den humanen Enteroviren B auch die Coxsackie-Viren B sowie die Echoviren umfasst. Weiterhin sind Coxsackie-Viren C und Polioviren sowie die humanen Enteroviren C der Spezies der Enteroviren C zugeordnet.^{2,3,4} Enteroviren infizieren hauptsächlich Säuglinge und Kleinkinder und können über den fäkal-oralen Weg übertragen werden und seltener auch über Tröpfcheninfektion und kontaminiertes Wasser. Die meisten Enterovirus-Infektionen verlaufen asymptomatisch oder mit milden erkältungsähnlichen Symptomen. Durch die Vielzahl der Enterovirus-Spezies ist das Krankheitsbild bei schweren symptomatischen Erkrankungen jedoch breit gefächert. So können Infektionen mit Enteroviren auch Kinderlähmung, die Hand-Fuß-Mund-Krankheit sowie Meningitis und Myokarditis hervorrufen.⁴

Polioviren sind einzelsträngige RNA- (ss-RNA) Viren und waren vor ihrer teilweisen Ausrottung durch Impfung weltweit verbreitet. Neben milden Symptomen wie Fieber und Husten kann das Poliovirus auch Kinderlähmung (Poliomyelitis) hervorrufen. Obwohl immer wieder einzelne Ausbrüche von Poliomyelitis gemeldet werden, sind die Fallzahlen weltweit rückläufig. So wurden 2016 nur noch 37 Infektionen mit Poliovirus Typ 1 und keine mit Poliovirus Typ 3 gezählt. Poliovirus Typ 2 gilt seit September 2015 als ausgerottet.⁵

Coxsackie-Virus A und B wurden 1984 das erste Mal gemeldet und nach ihrem Entdeckungsort Coxsackie, New York benannt. Coxsackie-Viren sind weltweit verbreitet und beide Stämme können zu der sogenannten „Sommergrippe“ führen. Die Hand-Fuß-Mund-Krankheit wird in den USA am häufigsten durch Coxsackie-Virus A16 hervorgerufen während andere schwerwiegende Coxsackie-Virus-Erkrankungen Konjunktivitis und Myokarditis sind. Neben Coxsackie-Viren führt auch eine Infektion mit humanem Enterovirus 70 zu einer schweren Konjunktivitis.^{6,7} Das humane Enterovirus 71 kann zur Hand-Fuß-Mund-Krankheit führen, eine Infektion mit Enterovirus 71 verläuft aber zu großen Teilen asymptomatisch. Dieses

einzelsträngige RNA-(ss-RNA) Virus ist weltweit verbreitet und tritt vor allem im Spätsommer und Herbst auf.^{4,9}

Echovirus ist hoch infektiös und kommt häufig bei Kindern vor. Eine Infektion mit Echoviren kann unter anderem zu einer aseptischen Meningitis führen, wobei Echovirus 30 der in Europa, Amerika und Asien am häufigsten vorkommende Serotyp dieser Erkrankung ist.⁸

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE Enterovirus ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Enterovirus-RNA in humanen Stuhlproben und Liquor. 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 Enterovirus spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time RT-PCR amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen (5'-UTR) 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 Enterovirus 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	<u>Reaction Mix</u>	2x	1050 µl	gelb
2	<u>Enzyme Mix</u>	1x	80 µl	rot
R	<u>Internal Control RNA</u>	2x	1700 µl	braun
N	<u>No Template Control</u>	1x	450 µl	weiß
P	<u>Positive Control</u>	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 Enterovirus 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® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler®480z
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.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und LightCycler® 480z
- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- 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.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die RNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältlichliches RNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder RNA-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 Enterovirus 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.

8.2 RNA-Präparation aus Liquor

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

Der RIDA®GENE Enterovirus 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	<u>Reaction Mix</u>	19,3 µl	212,3 µl
2	<u>Enzyme Mix</u>	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	<u>Reaction Mix</u>	19,3 µl	212,3 µl
2	<u>Enzyme Mix</u>	0,7 µl	7,7 µl
R	<u>Internal Control RNA</u>	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des RT-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 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 selben 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® 2.0	Enterovirus	530	RIDA®GENE Color Compensation II (PG0002) wird benötigt
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Enterovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480z	Enterovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	540/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Enterovirus	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
ABI 7500	Enterovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Enterovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Enterovirus	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein
	ICR	Yellow	

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).

Die **Positive Control** liegt 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

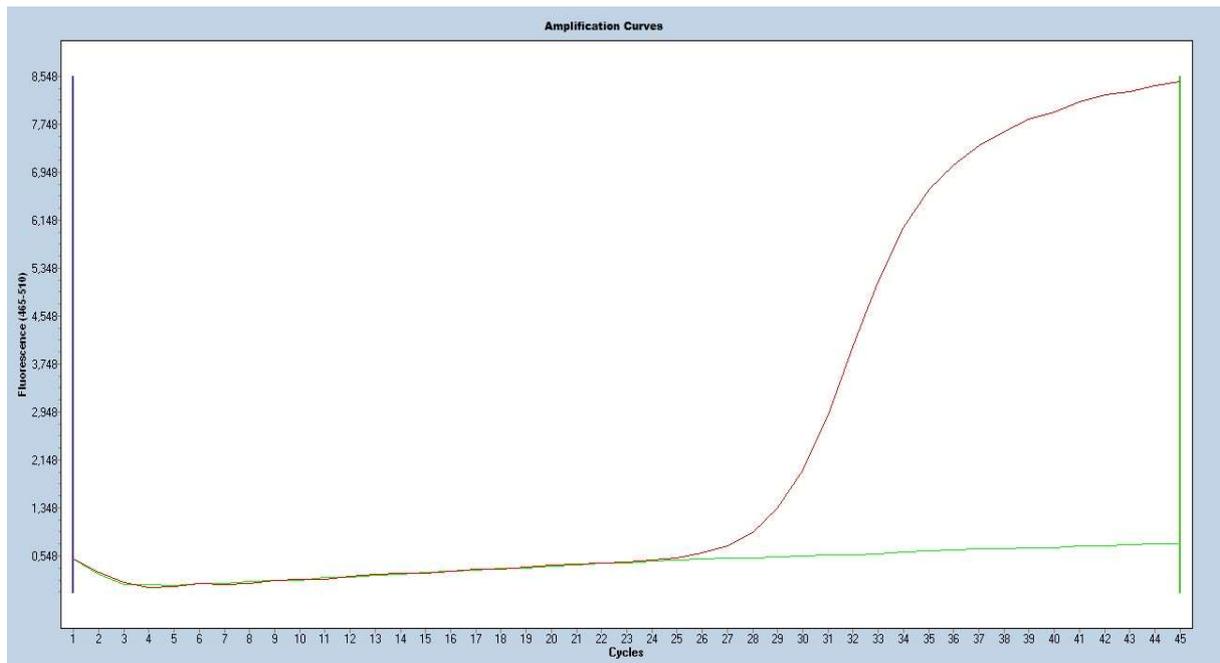


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (Enterovirus) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

Zielgen		
Enterovirus	ICR	Ergebnis
positiv	positiv/negativ	Enterovirus nachweisbar
negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

Enterovirus ist nachweisbar, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt und eine Amplifikation für die Internal Control RNA im Nachweissystem zu sehen ist.

Enterovirus ist ebenfalls nachweisbar, 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.

Enterovirus ist nicht nachweisbar, 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 für Enterovirus und die Internal Control RNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. 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 und Liquor geeignet.
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 unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Enterovirus 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 (5'-UTR) vorhanden sind.
8. Rhinoviren gehören zur Familie der *Picornaviridae*. Aufgrund überlappender Sequenzen kann nicht ausgeschlossen werden, dass der RIDA®GENE Enterovirus Test eine Querempfindlichkeit zu Rhinoviren zeigt.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 124 extrahierte Stuhl- und Liquorproben mit dem RIDA®GENE Enterovirus Test und einer in-house real-time PCR an einem Institut in Deutschland untersucht.

Tab. 10: Korrelation der Enterovirus-Ergebnisse mit der RIDA®GENE Enterovirus real-time RT-PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Enterovirus	Positiv	40	0	40	PPV: 100,0 %
	Negativ	1	83	84	NPV: 98,8 %
	Insgesamt	41	83	124	

13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 RNA-Kopien/Reaktion für Enterovirus.

Die folgende Abbildung 2 zeigt eine Verdünnungsreihe von Enterovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II.

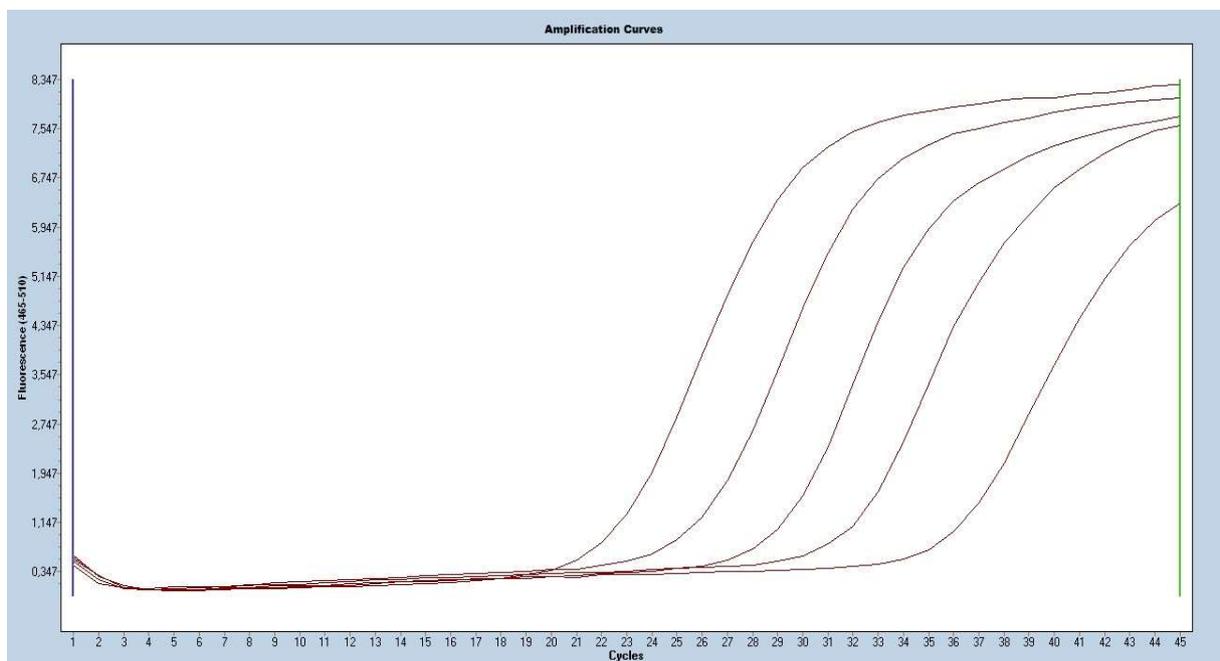


Abb. 2: Verdünnungsreihe Enterovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

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

13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Enterovirus. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 11):

Tab. 11: Kreuzreaktivitätstestung

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	Respiratory syncytial virus, human, strain Long	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-
Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	Rhinovirus, human, Genogruppe A	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	Influenza virus A/PR/8/34	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Astrovirus	-	Coronavirus 229E, human	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Metapneumovirus, human	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Cytomegalovirus, human	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG I	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Norovirus GG II	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	Parainfluenza virus 1, human, strain C35	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Parainfluenza virus 2, human, strain Greer	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Parainfluenza virus, serotype 3	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-

<i>Candida albicans</i>	-	Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Parainfluenza virus 4b, human, strain CH19503	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-				

13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Stämmen der Gattung Enterovirus untersucht (s. Tab. 12). Alle Stämme des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR oder mittels Sequenzabgleich (*) nachgewiesen.

Tab. 12: Analytische Reaktivitätstestung

Enterovirus					
Enterovirus A					
Enterovirus type 71	+	Coxsackievirus A9	+		
Enterovirus B					
Coxsackievirus B1	+	Coxsackievirus B2	+	Coxsackievirus B3	+
Coxsackievirus B4	+	Coxsackievirus B5	+	Echovirus type 6	+
Echovirus type 7	+	Echovirus type 11	+	Echovirus type 20	+
Echovirus type 25	+	Echovirus type 30	+		
Enterovirus C					
Poliovirus type 1	+	Poliovirus type 2	+	Poliovirus type 3	+
Enterovirus D					
Enterovirus type 68*	+				

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-05-21	Vorversion
2021-01-29	Generelle Überarbeitung 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -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. Piqueur M *et al.* Improvement of a real-time PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virology Journal* 2009, 6: 95-97.
2. ICTV Master Species List 2018 - (10th Report) - Master Species Lists - Master Species Lists - ICTV Collaboration". <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/8266ictvonline.org>. (aufgerufen am 22.05.2019)
3. The Pirbright Institute, UK, The Picornavirus Pages (aufgerufen am 22.05.2019)
4. De Crom *et al.* Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur J Pediatr* 2016, 175 (8):1023-9.
5. Diop O *et al.* Virologic Monitoring of Poliovirus Type 2 after Oral Poliovirus Vaccine Type 2 Withdrawal in April 2016 — Worldwide, 2016–2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2016. 66, 20. Centers for Disease Control and Prevention.
6. Center for Disease Control and Prevention: Non-Polio Enterovirus infection – Outbreaks & Surveillance.
7. Kiehl H. Infektionen durch Enteroviren. RobertKoch Institut, Kompendium Infektiologie & Infektionsschutz. H. Hoffmann GmbH Verlag 2009.
8. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 7. Oktober 2013. Häufungen von Echovirus-30-bedingten Meningitiden 2013.
9. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 20. Mai 2008. Enterovirus-71-Infektionen: Zum Auftreten der Hand-Fuß-Mund-Krankheit in Südostasien. 2008.