

## RIDA® GENE E. coli Stool Panel I

**REF** PG2285



## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA® GENE E. coli Stool Panel I ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung der Gene für die Virulenzfaktoren von EPEC und STEC (stx1, stx2 und eae) in humanen Stuhlproben.<sup>1,2</sup>

Die RIDA® GENE E. coli Stool Panel I multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch EPEC bzw. STEC verursachte Gastroenteritis unterstützen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

*Escherichia coli* (*E. coli*) sind gram-negative, durch peritriche Begeißelung bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien und gehören zur Familie der Enterobacteriaceae. *E. coli* ist Bestandteil der normalen Darmflora des Menschen, aber auch vieler landwirtschaftlicher Nutztiere und ist in der Regel apathogen. Einige Stämme von *E. coli* sind durch den Erwerb von bestimmten Pathogenitätsfaktoren (z.B. Toxin-Genen) humanpathogen.

Die sechs bekannten darmpathogenen *E. coli* enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und diffus adhärente *E. coli* (DAEC) lassen sich durch die spezifischen Pathogenitätsfaktoren differenzieren.<sup>3</sup>

Eine besondere Bedeutung unter den darmpathogenen *E. coli* haben die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) erlangt. Jedes Jahr werden in Deutschland ca. 1000 EHEC-Erkrankungen gemeldet.

EHEC sind eine Untergruppe der Shigatoxin- bzw. Verotoxin-bildenden *E. coli* (STEC bzw. VTEC) und haben die Fähigkeit zur Bildung zweier Zytotoxine, Verotoxin 1 und 2. Wegen der Ähnlichkeit der Verotoxine zum Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* werden die VTEC synonym auch als STEC bezeichnet. Ein weiterer wichtiger diagnostischer EHEC Pathogenitätsfaktor ist neben stx1/stx2 (Shiga-Toxin Gene) das eae-Gen (*E. coli* attaching and effacing Gen), welches Intimin codiert. Intimin befähigt den Erreger u.a. sich an die Darmepithelzellen anzuheften.

Die klinischen Symptome, die durch EHEC verursacht werden, reichen von leichten Durchfällen über schwere Gastroenteritiden bis hin zur hämorrhagischen Colitis, die in ca. 10 bis 20 % der Infektionen vorkommt. Als lebensbedrohliche postinfektiöse Komplikation kann es bei 5 - 10 % der Infektionen besonders bei Säuglingen und kleinen Kindern, aber auch bei alten oder immungeschwächten Patienten zur Ausbildung eines hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) oder einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) kommen. Die Letalität bei HUS und TTP ist besonders im Kindesalter hoch (ca. 10 - 15 %). Es kann akutes Nierenversagen mit vorübergehender Dialysepflicht, aber auch ein irreversibler Verlust der Nierenfunktion mit daraus resultierender ständiger Dialyse eintreten. Die Inkubationszeit liegt bei 2 bis 10 Tagen. Wegen seiner hohen Umweltresistenz liegt die Infektionsdosis für EHEC bei nur 100 Keimen. Infektionsquellen sind von Rindern, Schafen oder Ziegen

gewonnene kontaminierte Lebensmittel, besonders rohes oder nicht ausreichend erhitztes Fleisch oder Fleischprodukte, nicht pasteurisierte Roh- oder Vorzugsmilch sowie kontaminierte Obst und Gemüseprodukte. Aber auch Infektionsketten von Mensch zu Mensch, besonders in Gemeinschaftseinrichtungen wie Kindergärten, Altenheimen oder Krankenhäusern sowie direkte Kontakte zu Tieren sind von Bedeutung.<sup>4,5</sup>

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) verursachen vor allem bei (Klein-) Kindern Durchfallerkrankungen. Der EPEC Pathogenitätsfaktor ist ebenfalls das eae-Gen.<sup>4</sup>

### 3. Testprinzip

RIDA<sup>®</sup>GENE *E. coli* Stool Panel I ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung der Gene für die Virulenzfaktoren von EPEC und STEC. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente der Virulenzfaktoren stx1, stx2 und eae 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<sup>®</sup>GENE *E. coli* 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 **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 E. coli 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, 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 (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](http://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<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)) für Stuhlproben 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 1.000 x g zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA<sup>®</sup>GENE E.coli 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. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control DNA** 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, 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	<u>Reaction Mix</u>	19,3 µl	212,3 µl
2	<u>Taq-Polymerase</u>	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	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
	<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 DNA-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 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 und Rotor-Gene Q

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, 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

<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, CFX96™ und Rotor-Gene Q

<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
Roche LightCycler® 480II	stx2	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
	stx1	533/610	
	eae	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	stx2	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	540/580	
	stx1	540/610	
	eae	610/670	
ABI 7500	stx2	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	stx1	ROX	
	eae	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	stx2	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	stx1	ROX	
	eae	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	stx2	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	stx1	Orange	
	eae	Red	
Bio-Rad CFX96™	stx2	FAM	-
	ICD	VIC	
	stx1	ROX	
	eae	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).

Die **Positive Control** liegt für stx1, stx2 und eae 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 * <sup>1</sup>	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

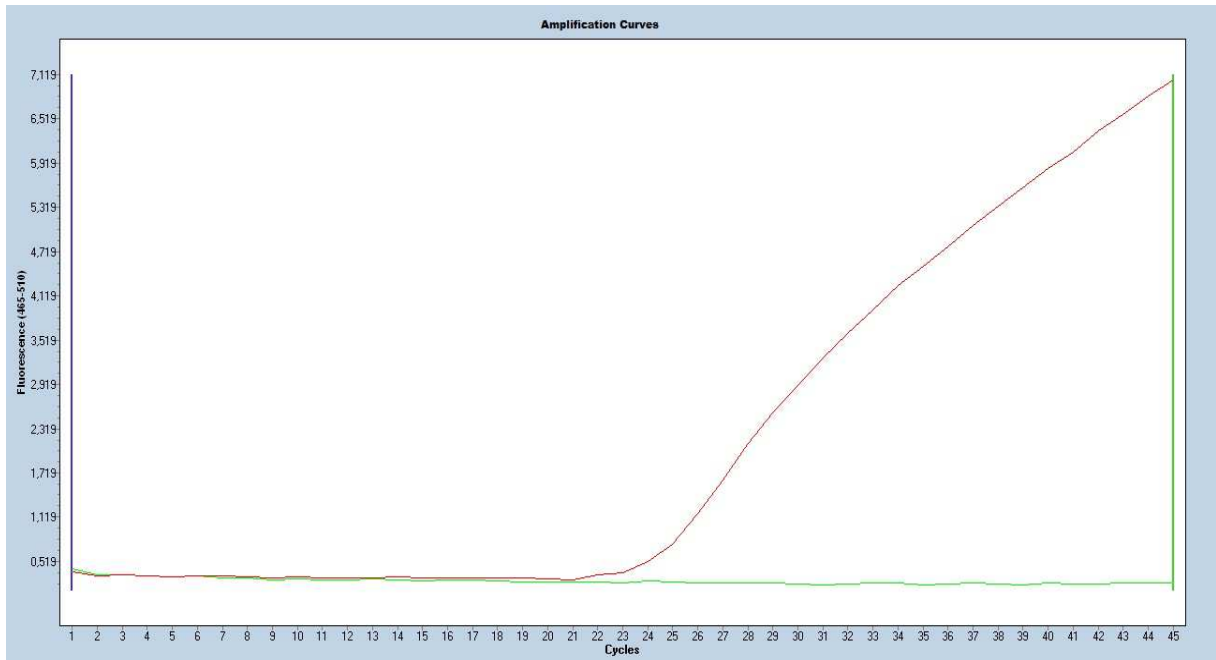
\*<sup>1</sup> Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

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

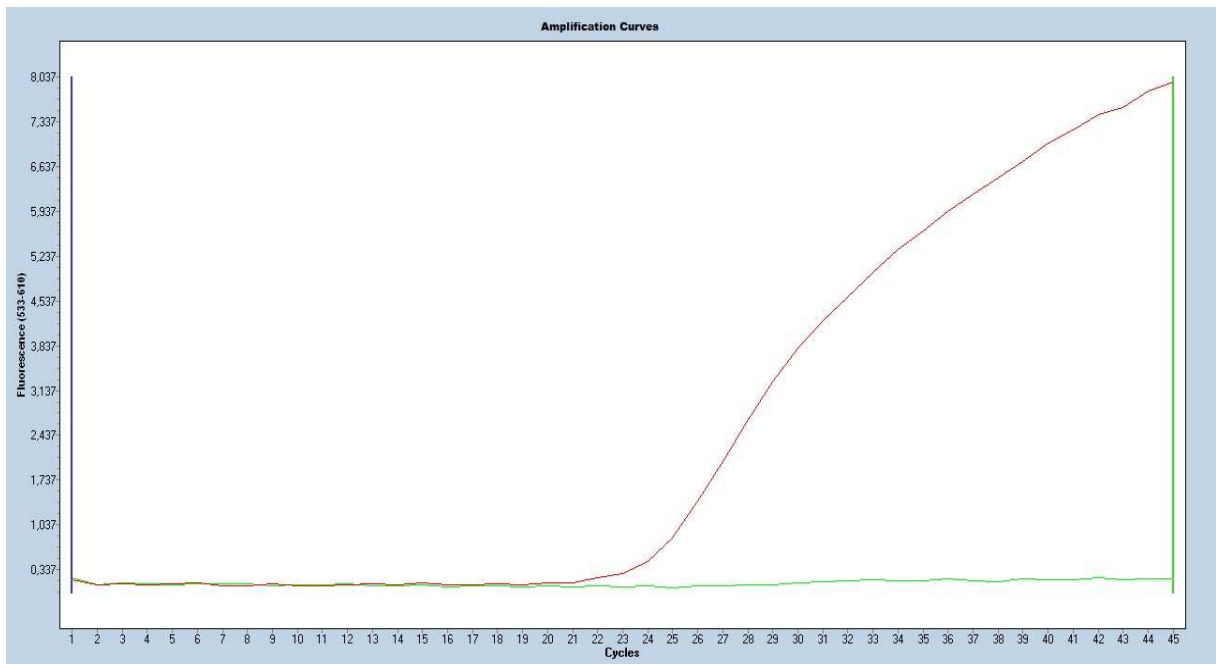
Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

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

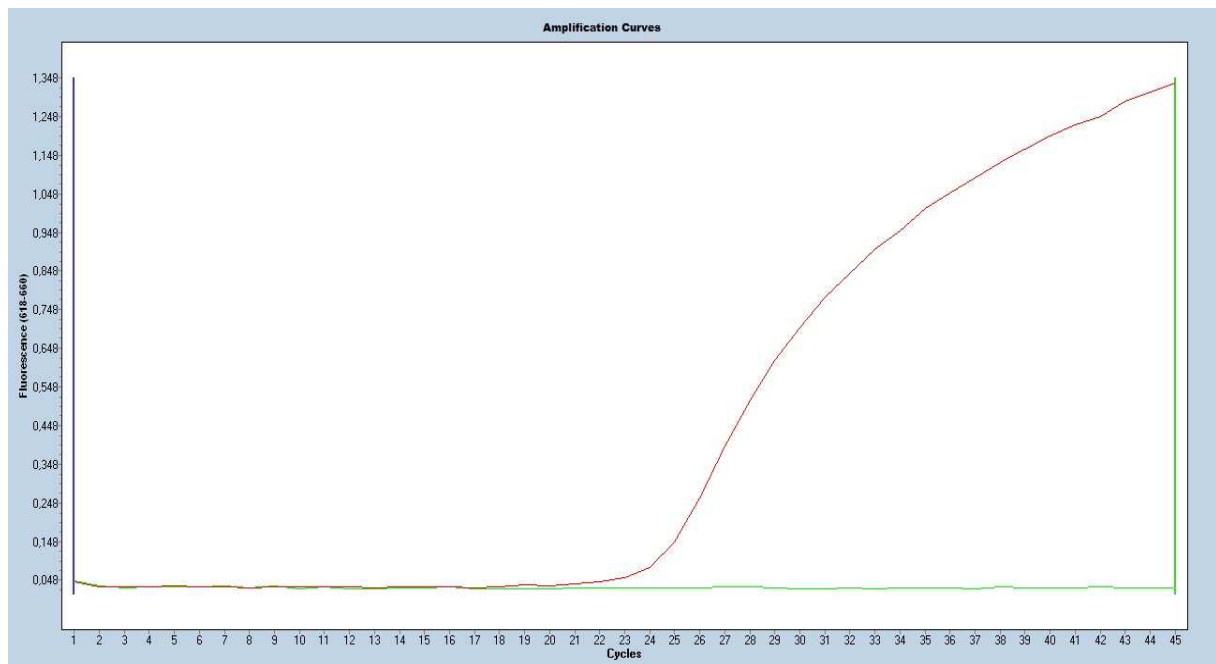
- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb.1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (stx2) auf dem LightCycler® 480II



**Abb.2:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (stx1) auf dem LightCycler® 480II



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

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

**Tab. 11:** Interpretation der Ergebnisse

Pathogenitätsfaktor-Gene			ICD	Ergebnis
stx2	stx1	eae		
<b>positiv</b>	negativ	negativ	<b>positiv/negativ</b>	<b>STEC (EHEC) nachweisbar</b>
negativ	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv/negativ</b>	<b>STEC (EHEC) nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv/negativ</b>	<b>STEC (EHEC) nachweisbar</b>
negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv/negativ</b>	<b>EPEC nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv/negativ</b>	<b>EHEC nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv/negativ</b>	<b>EHEC nachweisbar</b>
negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv/negativ</b>	<b>EHEC nachweisbar</b>
negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>Zielgene nicht nachweisbar</b>
negativ	negativ	negativ	negativ	<b>Ungültig</b>

Im Infektionsschutzgesetz (IfSG) werden unter dem Begriff EHEC diejenigen STEC (Shigatoxin-produzierende *E.coli*) verstanden, die humanpathogen sind. Da eine genaue Definition humanpathogener STEC gegenwärtig nicht möglich ist, wird **jeder** STEC als potentieller EHEC angesehen.<sup>5</sup>

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

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

Eine Probe ist ungültig, wenn die Probe-DNA und die **Internal Control DNA** im keine Amplifikation 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 des Verfahrens

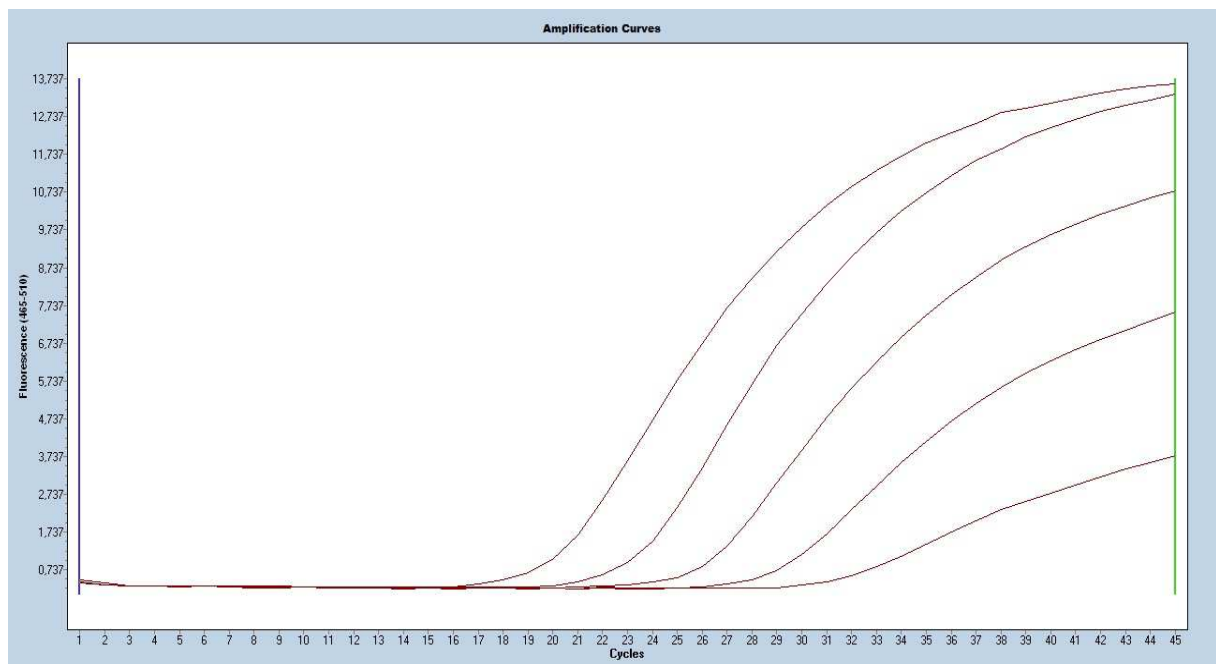
1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhlproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung 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<sup>®</sup> GENE E. coli 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 (stx1, stx2 und eae) vorhanden sind.

### 13.1 Analytische Sensitivität

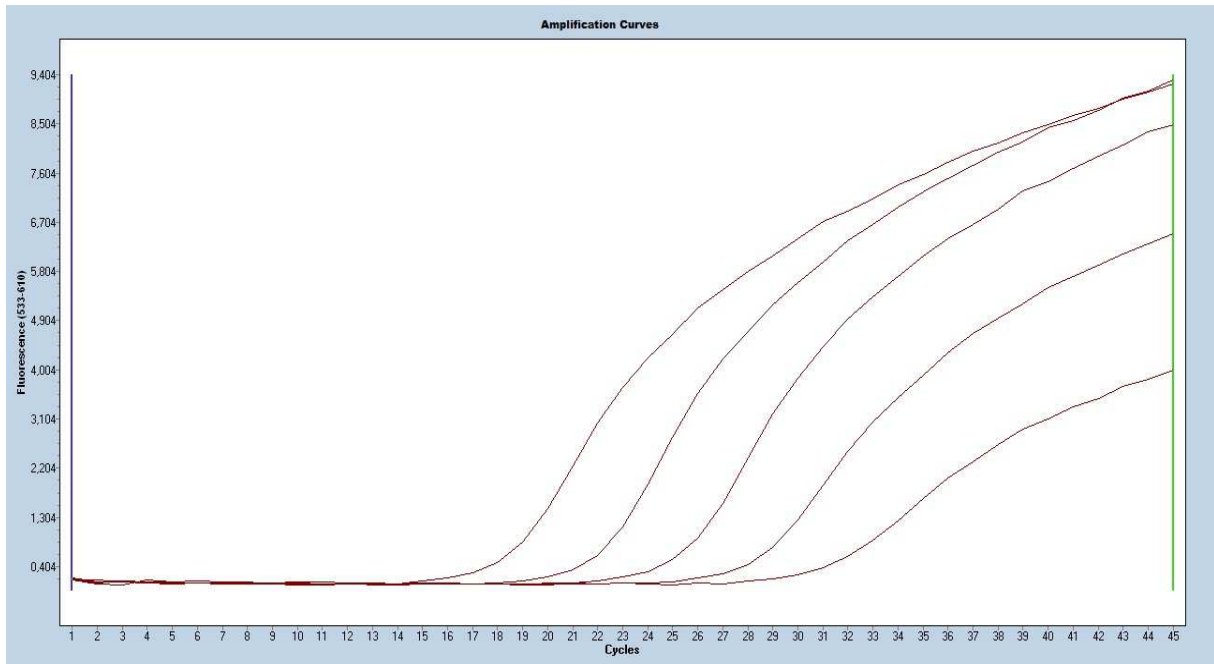
Die RIDA<sup>®</sup> GENE E. coli Stool Panel I multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 10$  DNA-Kopien/Reaktion für stx2, stx1 und eae.

Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen Verdünnungsreihen von stx1, stx2 und eae (jeweils  $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II.

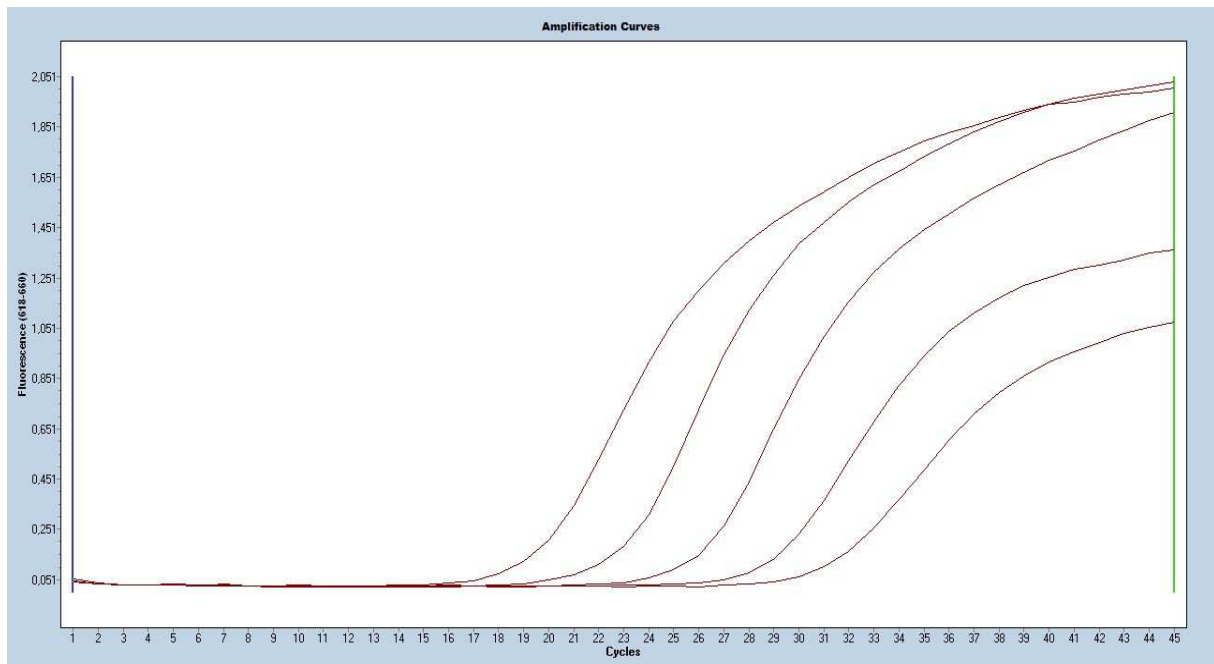


**Abb. 4:** Verdünnungsreihe Shigatoxin-Gen stx2 ( $10^5 - 10^1$  DNA-Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II





**Abb. 5:** Verdünnungsreihe Shigatoxin-Gen stx1 ( $10^5 - 10^1$  DNA-Kopien) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Abb. 6:** Verdünnungsreihe eae-Gen ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II

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

## 13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA<sup>®</sup>GENE E. coli Stool Panel I multiplex real-time PCR ist spezifisch für stx1, stx2 und eae. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 13):

**Tab. 13:** Kreuzreaktivitätstestung

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

### 13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA<sup>®</sup>GENE E. coli Stool Panel I multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen stx1- und stx2-Subtypen untersucht (s. Tab. 14). Folgende Untereinheiten wurden mit der RIDA<sup>®</sup>GENE E. coli Stool Panel I multiplex real-time PCR nachgewiesen:

**Tab. 14** Analytische Reaktivitätstestung










stx1-Subtypen					
stx1a	+	stx1c	+	stx1d	+
stx2 Subtypen					
stx2a	+	stx2d	+	stx2g	+
stx2b	+	stx2e	+		
stx2c	+	stx2f	+		
eae Subtypen					
eae alpha	+	eae gamma	+		

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2016-05-27	Freigabeversion
2018-06-08	Generelle Überarbeitung
2018-06-08	4. Packungsinhalt 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 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. Müller D, et al. Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73 (10): 3380–3390.
2. Thiem VD, et al. Detection of *Shigella* by a PCR Assay Targeting the *ipaH* Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
3. Kaper JM, et al. PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:123-140.
4. Nataro JP and Kaper JM. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(1): 132-201.
5. Robert Koch Institut. Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). RKI-Ratgeber für Ärzte 2008.