

RIDA® UNITY EHEC/EPEC

REF UN2205



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Deutschland

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®UNITY EHEC/EPEC Test, welcher auf der RIDA®UNITY Plattform durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von DNA für die Virulenzfaktoren von EHEC, STEC, EPEC und EIEC/Shigella spp. aus unbehandelten humanen Stuhlproben und Kulturproben von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer akuten Gastroenteritis

Der RIDA®UNITY EHEC/EPEC Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von *E. coli*-Infektionen (EHEC, EPEC, STEC und EIEC/Shigella spp.) bei Patienten mit Symptomen einer Gastroenteritis in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine *E. coli*-Infektion (EHEC, EPEC, STEC und EIEC/Shigella spp.) nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für die professionelle Anwendung vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Durchfallerkrankungen sind ein wichtiges Gesundheitsproblem und verursachen bei Kindern weltweit ca. 1,7 Milliarden Fälle pro Jahr⁽¹⁾. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gelten sie als zweithäufigste Ursache mit jährlich etwa 525.000 Todesfällen bei Kindern unter 5 Jahren, insbesondere in den Entwicklungsländern⁽¹⁾. Zu den häufigsten bakteriellen Erregern einer Durchfallerkrankung zählt u. a. *Escherichia coli*⁽²⁾.

E. coli ist ein gram-negativer, laktosefermentierender, beweglicher Bazillus und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Er ist ein normaler Bewohner des Magen-Darm-Trakts, kann aber auch, insbesondere in Entwicklungsländern, Durchfallerkrankungen mit hoher Morbidität und Mortalität bei Kindern verursachen. Anhand ihrer Virulenzmerkmale, der Epidemiologie und der klinischen Manifestationen wurden folgende Klassen von diarrhogenen *E. coli* identifiziert: Enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxigene *E. coli* (ETEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und enteroaggregative *E. coli* (EAEC). All diese diarrhogenen Pathotypen von *E. coli* können über den fäkal-oralen Weg übertragen werden⁽³⁾.

Eine besondere Bedeutung unter den darmpathogenen *E. coli* haben die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) erlangt. Sie sind eine Untergruppe der Shiga-Toxin bzw. Verotoxin bildenden *E. coli* (STEC bzw. VTEC). Die Pathogenität von STEC ist auf die Fähigkeit, den Darm durch Anhaftung an die Darmepithelzellen zu besiedeln, zurückzuführen. Nach der Besiedlung sind sie in der Lage, zwei Zytotoxine, Verotoxin 1 und 2, zu produzieren. 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 das Membranprotein Intimin codiert. Dieses Membranprotein ist für die Anheftung des Erregers an den Darmepithelzellen verantwortlich⁽⁴⁾. Klinische Symptome, die beim Menschen durch EHEC/STEC verursacht werden können, reichen von blutigem Durchfall bis hin zu dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS)^(2, 5). Infektionsquellen sind vor allem kontaminierte Lebensmittel, wobei für eine EHEC/STEC-Infektion weniger als 1000 Bakterien ausreichend sind. Der bisher schwerwiegendste lebensmittelbedingte Ausbruch durch STEC ereignete sich im Jahr 2011 in Deutschland. Dieser führte zu 3816 identifizierten STEC-Infektionen und 54 Todesfällen, von denen 32 HUS-assoziiert waren⁽⁵⁾.

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) sind bekannt als Ursache für kindliche Durchfallerkrankungen, insbesondere in Entwicklungsländern⁽³⁾. EPEC unterscheiden sich von EHEC durch das Fehlen von Shiga-Toxinen⁽³⁾. Die häufigsten Symptome, die mit einer EPEC-Infektion einhergehen, sind wässriger Durchfall, Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Fieber, wobei die infektiöse Dosis bei gesunden Erwachsenen bei etwa 10^8 Organismen liegt⁽⁵⁾.

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und *Shigella* spp. verursachen ebenfalls weltweit Durchfallerkrankungen, insbesondere in Entwicklungsländern. Es sind beides gram-negative Bakterien, die biochemisch und genetisch eng miteinander verwandt sind⁽⁶⁾. Die Pathogenität von EIEC und *Shigella* spp. beruht auf dem Plasmid-vermittelten Eindringen in Darmepithelzellen und deren Zerstörung. Für diesen Prozess sind die Produkte des Invasionsplasmid-Antigen-Gen H (*ipaH*) verantwortlich. Dieses Gen ist für den Nachweis von EIEC/*Shigella* spp. relevant, was eine Abgrenzung zu EHEC möglich macht. Ausbrüche von EIEC/*Shigella* spp.-Infektionen gelten hauptsächlich als lebensmittelbedingt und äußern sich mit Durchfall, Bauchschmerzen, Übelkeit und Fieber⁽⁶⁾.

3. Testprinzip

Der RIDA®UNITY EHEC/EPEC ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung der Gene für die Virulenzfaktoren von EHEC, STEC, EPEC und EIEC/*Shigella* spp. aus humanen Stuhl- oder Kulturproben. Die Abarbeitung erfolgt ausschließlich automatisiert mit dem RIDA®UNITY System. Zunächst erfolgt die Extraktion der Nukleinsäuren mithilfe des RIDA®UNITY Universal Extraction Kit und unter Verwendung des Internal Control Kits. Der Nachweis der Targetsequenz erfolgt immer im One-Step real-time RT-PCR Format (auch bei DNA Assays), d.h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA (falls vorhanden) wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die spezifischen Genfragmente der Virulenzfaktoren *stx1/stx2*, *eae* und *ipaH* 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. Um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können, ist eine parallele Anwendung des RIDA®UNITY Internal Control Kit nötig.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 96 Bestimmungen*.

Tab. 1: Packungsinhalt

REF	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µl	gelb, gebrauchsfertig
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µl	rot, gebrauchsfertig
UNZ2205PC	Positive Control	1 ×	200 µl	blau, gebrauchsfertig
UNZ2205NC	Negative Control	1 ×	450 µl	weiß, gebrauchsfertig

* bei mehrfacher Verwendung und kleineren Serien kann sich die Anzahl der Reaktionen verringern.

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -16 °C bis -28 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 8 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaften nicht.

Tab. 2: Lagerungsbedingungen und -hinweise

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-16 °C bis -28 °C	Bis zum aufgedrucktem Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-16 °C bis -28 °C	8 Tau-/Frier-Zyklen

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR Test ist ausschließlich für die Verwendung mit dem RIDA®UNITY System geeignet. Für eine korrekte Anwendung sind folgende Produkte zwingend erforderlich:

6.1 Reagenzien

Folgende Reagenzien werden für die Anwendung des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Tests benötigt:

Reagenzien	Artikelnummer
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Anwendung des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Tests benötigt:

Zubehör
RIDA®UNITY System; Artikelnummer: ZUNITY (R-Biopharm AG)
RIDA®UNITY-Verbrauchsmaterialien (Spitzen, Platten, Reaktionsgefäße, Folien) - Siehe hierzu Bedienungsanleitung RIDA®UNITY System Bestellinformationen Verbrauchsmaterial
Vortexer
Tischzentrifuge
Puderfreie Einmalhandschuhe
Externer Cycler (mögliche Systemerweiterung)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Das RIDA®UNITY EHEC/EPEC Kit kann in Verbindung mit anderen kompatiblen Cyclern verwendet werden. Alternative real-time PCR-Geräte müssen durch den Anwender verifiziert/validiert werden. Kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG zur Überprüfung der Kompatibilität unter pcr@r-biopharm.de.

7. Vorsichtsmaßnahmen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem 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. Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase / RNase).

Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.

Das Austauschen und Vermischen der Komponenten (Reaction Mix, Enzyme-Mix, Positive Control, Negative Control) einer Kit-Charge mit den Komponenten einer anderen Charge ist untersagt.

Das Testkit kann nach erstmaliger Öffnung bis zu 8 Wochen lang verwendet werden (ein erneutes Laden bis zu 6 mal ist hierbei möglich). Nach Erreichen des Verfallsdatums sollte das Testkit nicht mehr verwendet werden. Diese Vorgaben werden ebenfalls durch das RIDA[®]UNITY System überprüft.

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 zum Safety Data Sheet (SDS) finden Sie unter der Artikelnummer auf <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Für Anwender in der Europäischen Union: Im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegenden Vorfälle sind der R-Biopharm AG und der zuständigen nationalen Behörde zu melden.

Der Kurzbericht über Sicherheit und Leistung (SSP) für dieses Produkt ist nach dem Start der Europäischen Datenbank für Medizinprodukte/EUDAMED unter <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> verfügbar. Suchen Sie nach dem Produkt in der Datenbank mit der UDI-DI, welche sich auf der Außenverpackung des Produktes befindet.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Für die bestmögliche Performance des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Assay wird die Verwendung von frischem Probenmaterial empfohlen.

Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden.

Stuhlproben sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit den RIDA®UNITY Tests auftreten können.

Es wird empfohlen, Aliquots der Proben herzustellen, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Gefrorene Proben sollten direkt vor der Extraktion aufgetaut werden, um eine Degradation der Nukleinsäuren zu verhindern.

Bitte folgen Sie den Probenlagerungsvorgaben in Tabelle 3 bis 6.

Tab. 3: Probenlagerung - Nachweis EHEC

Native Proben - Stuhl		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 Tage	≤ 7 Tage	≤ 6 Monate

Native Proben - Kultur		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 Tage	≤ 1 Tage	-

Im Eluat (aus Stuhl oder Kultur)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 Stunden	≤ 36 Stunden	≤ 7 Tage

Bei einer Lagerung von -20 °C / - 80 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen der Stuhlprobe bis zu 5 Mal die Testeigenschaft nicht.

Bei einer Lagerung von -20 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen des Eluates (aus Stuhl oder Kultur) bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht.

Es sollte keine Kultur aus zuvor eingefrorenem Stuhl angezüchtet werden da durch das Einfrieren die Wachstumseigenschaften der Erreger stark beeinträchtigt werden und es hierdurch möglicherweise zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.

Tab. 4: Probenlagerung - Nachweis STEC

Native Proben - Stuhl		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 Tage	≤ 7 Tage	≤ 6 Monate

Native Proben - Kultur		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 Tage	≤ 1 Tage	-

Im Eluat (aus Stuhl oder Kultur)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤24 Stunden	≤ 36 Stunden	≤ 7 Tage

Bei einer Lagerung von -20 °C / - 80 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen der Stuhlprobe bis zu 5 Mal die Testeigenschaft nicht.

Bei einer Lagerung von -20 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen des Eluates (aus Stuhl oder Kultur) bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht.

Es sollte keine Kultur aus zuvor eingefrorenem Stuhl angezüchtet werden da durch das Einfrieren die Wachstumseigenschaften der Erreger stark beeinträchtigt werden und es hierdurch möglicherweise zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.

Tab. 5: Probenlagerung - Nachweis EPEC

Native Proben - Stuhl		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 Tage	≤ 7 Tage	≤ 6 Monate

Native Proben - Kultur		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 Tage	≤ 1 Tage	-

Im Eluat (aus Stuhl oder Kultur)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 Stunden	≤ 36 Stunden	≤ 7 Tage

Bei einer Lagerung von -20 °C / - 80 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen der Stuhlprobe bis zu 5 Mal die Testeigenschaft nicht.

Bei einer Lagerung von -20 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen des Eluates (aus Stuhl oder Kultur) bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht.

Es sollte keine Kultur aus zuvor eingefrorenem Stuhl angezüchtet werden da durch das Einfrieren die Wachstumseigenschaften der Erreger stark beeinträchtigt werden und es hierdurch möglicherweise zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.

Tab. 6: Probenlagerung - Nachweis EIEC / *Shigella* spp.

Native Proben - Stuhl		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 Tage	≤ 7 Tage	≤ 6 Monate

Native Probe - Kultur		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 1 Tage	-

Im Eluat (aus Stuhl oder Kultur)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤24 Stunden	≤ 36 Stunden	≤ 7 Tage

Bei einer Lagerung von -20 °C / - 80 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen der Stuhlprobe bis zu 5 Mal die Testeigenschaft nicht.

Bei einer Lagerung von -20 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen des Eluates (aus Stuhl oder Kultur) bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht.

Es sollte keine Kultur aus zuvor eingefrorenem Stuhl angezchtet werden da durch das Einfrieren die Wachstumseigenschaften der Erreger stark beeinträchtigt werden und es hierdurch möglicherweise zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.

8.1 DNA-Präparation aus Stuhl- und Kulturproben

Für die DNA-Isolierung aus Stuhl- und Kulturproben kommt das RIDA®UNITY Universal Extraction Kit zur Anwendung. Die korrekte Durchführung in der Gebrauchsanweisung des RIDA®UNITY Universal Extraction Kit ist zu beachten (Kapitel: Nukleinsäure-Präparation aus Stuhlproben; Kapitel: Nukleinsäure-Präparation aus Kulturproben).

9. Testdurchführung

Sowohl die Proben als auch die Reagenzien des RIDA®UNITY EHEC/EPEC werden zu Beginn der Anwendung bereits auf dem RIDA®UNITY System platziert.

Vorab sollten **Reaction Mix**, **Negative Control** und **Positive Control** mittels eines Vortexers ausreichend gemischt werden. Den **Enzyme Mix** nicht vortexen! Im Anschluss sind alle Komponenten kurz zu zentrifugieren.

Die PCR-Tubes für die zu untersuchenden Proben müssen in dem integrierten PCR-Cycler vorab positioniert werden.

Für die korrekte Beladung des Systems mit Reagenzien und Verbrauchsmaterial stehen entsprechende Carrier zu Verfügung. Die Beladung erfolgt nach Angabe des RIDA®UNITY Systems. Entsprechende Abschnitte im Handbuch des RIDA®UNITY Systems sind zu beachten (Kapitel: Durchführung eines Laufs).

Der RIDA®UNITY EHEC/EPEC Test darf nur in Kombination mit dem RIDA®UNITY Internal Control Kit angewendet werden. Dadurch kann eine mögliche PCR-Inhibition frühzeitig erkannt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt werden. Die Anwendung erfolgt entsprechend den Angaben in der Gebrauchsanweisung des RIDA®UNITY Internal Control Kits (Kapitel: Testdurchführung).

Die automatisierte Abarbeitung wird im Handbuch des RIDA®UNITY Systems beschrieben (Kapitel: Durchführung eines Laufs).

9.1 Geräteeinstellungen

9.1.1 Universal real-time PCR-Profil

Zur Harmonisierung der RIDA®UNITY Assays wird der RIDA®UNITY EHEC/EPEC Assay ausschließlich im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA- und RNA-Assays miteinander zu kombinieren. Daher ist im Universalprofil generell eine reverse Transkription vorangestellt.

Tab.7: Universal real-time PCR Profil für RIDA®UNITY

<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 CFX96™ Dx

<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.

9.2 Detektionskanaleinstellung

Tab.9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK Kanal stx
	Internal Control	HEX	SEEK Kanal ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK Kanal ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK Kanal eae
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK Kanal stx
	Internal Control	VIC	SEEK Kanal ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK Kanal ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK Kanal eae

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software RIDA®SEEK des RIDA®UNITY Systems. **Negative Control** und **Positive Control** müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 9).

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.

Die **Negative Control** beinhaltet bereits die RIDA®UNITY Internal Control. Da sie kein Template enthält, sind in den Target-Kanälen keine Signale zu erwarten. Positive Signale im IC-Kanal, mit dem die Internal Control detektiert wird, sind zwingend notwendig (s. Tab 10).

Tab.10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	IC Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	+	N/A*	Siehe Certificate of Analysis
Negativkontrolle	-	Ct > 20	0

*Der IC Kanal kann in der Positivkontrolle unter Umständen ein positives Signal zeigen und ist daher nicht zu bewerten.

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

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen in der PCR 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

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor.

11. Auswertung und Interpretation

Die Auswertung und Interpretation der Proben erfolgt über die Analyse-Software des RIDA®UNITY Systems, der RIDA®SEEK.

Derzeit gibt es weder eine international anerkannte Referenzmethode noch ein Referenzmaterial für die Standardisierung. Die Kontrollmaterialien sind auf die R-Biopharm AG internen Standards, basierend aus spezifischen DNA-Amplifikaten, metrologisch rückführbar.

Für weitere Informationen zur metrologischen Rückführbarkeit kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG.

Entnehmen Sie bitte die eingestellten Werte und Schwankungen sowie weitere Details dem Analysezertifikat (Certificate of Analysis, CoA).

Tab.11: Interpretation der Ergebnisse*

Nachweis von				
stx1/stx2	ipaH	eae	IC	Ergebnis
+	-	-	+/-	STEC (EHEC) nachweisbar
-	+	-	+/-	EIEC/<i>Shigella</i> spp. nachweisbar
-	-	+	+/-	EPEC nachweisbar
+	+	-	+/-	STEC (EHEC) und EIEC/<i>Shigella</i> spp. nachweisbar
+	-	+	+/-	EHEC nachweisbar
-	+	+	+/-	EIEC/<i>Shigella</i> spp. und EPEC nachweisbar
+	+	+	+/-	EHEC und EIEC/<i>Shigella</i> spp. nachweisbar
-	-	-	+	Zielgene nicht nachweisbar
-	-	-	-	Ungültig

*+= positiv
- = negativ

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.⁽⁵⁾

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-DNA und die Internal Control eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die Internal Control jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu

sehen ist. Der Nachweis der **Internal Control** ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der **Internal Control** führen können.

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

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control** keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf.

12. Grenzen der Methode

1. Der RIDA®UNITY EHEC/EPEC Test weist DNA für die Virulenzfaktoren von EHEC, STEC, EPEC und EIEC/*Shigella spp.* aus unbehandelten humanen Stuhlproben und Kulturproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Ct-Werts und dem Auftreten schwerer klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
2. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
3. Dieser Test ist nur zur automatischen Abarbeitung mit dem RIDA®UNITY System zugelassen.
4. Dieser Test wird nur für Stuhl- und Kulturproben verifiziert.
5. Bei Einsatz der Matrix Kultur eine Überführung des Agar-Mediums in die PCR Reaktion vermeiden, da dies zu möglichen Interferenzen führen kann.
6. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
7. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
8. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter der Nachweisgrenze (LoD 95 %) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
9. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®UNITY EHEC/EPEC zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
10. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (EHEC (*stx1/2*, *eae*), STEC (*stx1/2*), EPEC (*eae*) und EIEC/*Shigella spp.* (*ipaH*)) vorhanden sind.
11. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Gute Laborpraxis) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Klinische Leistungsmerkmale

Die RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR wurde in einem externen Labor mit einem CE-markierten Referenztest anhand von 276 Stuhlproben, von Patienten mit Symptomen einer gastrointestinalen Infektion, verglichen.

Die Ergebnisse zeigen eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis der Virulenzfaktoren von EHEC, STEC, EPEC und EIEC/*Shigella* spp. unter Verwendung des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Kits.

Tab. 12: Nachweis von *stx1/2* - Stuhlproben

		Referenz PCR		Gesamt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC- <i>stx 1/2</i>	Positiv	122	0	122
	Negativ	5	149	154
	Gesamt	127	149	276

Relative Sensitivität (95 % KI)	96,1 % (91,1 % - 98,7 %)
Relative Spezifität (95 % KI)	100 % (97,6 % - 100 %)

Tab. 13: Nachweis von *ipaH* - Stuhlproben

		Referenz PCR		Gesamt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC- <i>ipaH</i>	Positiv	65	0	65
	Negativ	0	211	211
	Gesamt	65	211	276

Relative Sensitivität (95 % KI)	100 % (94,5 % - 100 %)
Relative Spezifität (95 % KI)	100 % (98,3 % - 100 %)

Tab. 14: Nachweis von *eae* - Stuhlproben

		Referenz PCR		Gesamt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC- <i>eae</i>	Positiv	179	0	179
	Negativ	4	93	97
	Gesamt	183	93	276

Relative Sensitivität (95 % KI)	97,8 % (94,5 % - 100 %)
Relative Spezifität (95 % KI)	100 % (96,1 % - 100 %)

13.2 Analytische Leistungsmerkmale

13.2.1 Nachweisgrenze (LoD 95 %)

Zur Ermittlung des LoDs wurde pro Target jeweils eine positive Kontrollprobe (negative Stuhlproben, gespiked oder mittels Kulturprobe) in fünf Verdünnungsstufen (in 0,25 log-Stufen) mit 20 Replikaten pro Stufe mit einer Lot gemessen.

Darauffolgend wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Anschließend wurde die Bestätigung des berechneten LoD mit 20 Replikaten pro Target an der berechneten Verdünnungsstufe / Konzentration durchgeführt.

Für die Testung wurden folgende Stämme verwendet:

- *stx1/stx2*: *Escherichia coli* D3509 (da *stx2* mit dem hämolytisch-urämisches Syndrom assoziiert ist, wurde der LoD für *stx2* bestimmt)
- *ipaH*: *Escherichia coli* Fr1368
- *eae*: *Escherichia coli* DSM8695

Für den Nachweis von EHEC, STEC, EPEC und EIEC/*Shigella* spp. DNA mithilfe des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Assays auf dem UNITY System konnten folgende Nachweisgrenzen („Limit of detection“, LoD) bestimmt werden.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tab. 15: Ergebnisse der Nachweisgrenze des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Tests für die Targets *stx1/2*, *ipaH* und *eae*.

	Matrix	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Stuhl	476000 CFU/ml	5300 CFU/ml	125000 CFU/ml
	Kultur	2130 CFU/ml	798 CFU/ml	2890 CFU/ml

*CFU: Colony Forming Units

Der LoD für *stx1/2* in Stuhlproben wurde bei 476000 CFU/ml bestimmt.

Der LoD für *ipaH* in Stuhlproben wurde bei 5300 CFU/ml bestimmt.

Der LoD für *eae* in Stuhlproben wurde bei 125000 CFU/ml bestimmt.

Der LoD für *stx1/2* in Kulturproben wurde bei 2130 CFU/ml bestimmt.

Der LoD für *ipaH* in Kulturproben wurde bei 798 CFU/ml bestimmt.

Der LoD für *eae* in Kulturproben wurde bei 2890 CFU/ml bestimmt.

Für den erweiterten Workflow mit dem CFX96™ Dx konnten diese LoD Werte bestätigt werden unter der Voraussetzung, dass wir in einem 2-3-fachen LoD Bereich verbleiben.

13.2.2 Analytische Spezifität

Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen, die aufgrund verbreiteter Anwendung bei gastrointestinalen Infektionen oder verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben vorliegen könnten, untersucht.

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden zunächst mit hohen Konzentrationen (dreifache Tagesdosis oder Simulation des „worst case“) in einem Interferenz-Screen untersucht.

Für die in Tabelle 16 aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt.

Tab. 16: Potentiell interferierende Substanzen

Potentiell interferierende Substanz	Konzentration
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg Filmtabletten (Azithromycin)	0,75 % [w/v]
Bariumsulfat	18,5 % [v/v]
Cologran® Flüssigsüßstoff (Saccharin + Cyclamat)	1,3 % [w/v]
Humanblut	5 % [v/v]
Kohle-Tabletten 250mg (Kohle)	6 % [w/v]
Loperamid-ratiopharm® akut (Loperamid)	0,02 % [v/v]
Mucine	5 % [w/v]
Stearin- / Palmitinsäure	40 % [w/v]

Kreuzreaktivität

Verschiedene Organismen (Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren), die häufig in der Matrix Stuhl vorkommen können, wurden untersucht. Die Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen für diesen Assay beruhte entweder darauf, dass diese natürlicherweise in Stuhlproben zu finden sind oder als gastrointestinale Erreger entsprechende Symptome hervorrufen. Für Analysen wurden Bakterien- (zwischen 10^6 und 10^9 CFU/ml), Pilz- oder Viruskulturen, Überstände von Viruskulturen, Isolate sowie LGC-Standards der jeweiligen Organismen verwendet.

Die RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR ist spezifisch für EHEC, STEC, EPEC und EIEC/*Shigella* spp. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 17):

Tab. 17: Potentiell kreuzreaktive Organismen.

Organismus	Testergebnis*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adenovirus 40	-	-	-
Adenovirus 41, Human, strain Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
Astrovirus 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-	-

<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** Portland 1	-	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** WB Clone C6	-	-	-
<i>Giardia lamblia</i> **	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GI	-	-	-
Norovirus GII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (Serovar Enteritidis)	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (Serovar Typhimurium)	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-

* - = negativ

** *Giardia intestinalis* und *Giardia lamblia* entsprechen demselben Organismus.

13.2.3 Präzision

Die Präzision des RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR Tests wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

Intra-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem RIDA®UNITY unter identischen Bedingungen.

Inter-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben in 20 Läufen in Duplikaten an 10 Arbeitstagen (2 Läufe pro Tag) von unterschiedlichen Operatoren unter reproduzierbaren Bedingungen.

Die Testungen zur *Intra-* und *Inter-Assay* Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die erhaltenen Variationskoeffizienten der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR Test auf dem RIDA®UNITY und dem CFX96™ Dx lagen bei 4,29 %.

Tab. 18: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Tests für *stx1/2* aus Stuhlproben (RIDA®UNITY System).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	27,8	27,7	27,4	27,8	27,7	27,6	27,7
	VK (%)	1,02 %	1,19 %	1,11 %	3,25 %	3,19 %	3,18 %	3,21 %
2	Ct	29,6	29,5	29,2	30,0	29,8	29,8	29,8
	VK (%)	1,07 %	0,87 %	0,85 %	2,93 %	2,66 %	2,53 %	2,71 %
3	Ct	29,2	29,0	28,9	30,2	30,0	30,1	30,1
	VK (%)	1,72 %	1,35 %	1,46 %	3,29 %	2,85 %	3,15 %	3,10 %
4	Ct	-	-	-	32,0	31,7	31,6	31,8
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	2,15 %	2,23 %	2,26 %	2,28 %
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	VK (%)	2,34 %	2,05 %	2,13	N/A	N/A	N/A	N/A

Tab. 19: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Tests für *stx1/2* aus Stuhlproben (CFX96™ Dx).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	27,2	27,1	26,9	26,1	26,0	26,0	26,0
	VK (%)	0,82 %	1,04 %	0,76 %	3,12 %	2,61 %	2,64 %	2,80 %
2	Ct	27,6	27,2	27,1	28,1	27,5	27,5	27,7
	VK (%)	1,91 %	0,95 %	0,71 %	4,03 %	3,02 %	2,86 %	3,50 %
3	Ct	27,7	27,2	27,2	28,1	27,7	27,6	27,8
	VK (%)	2,34 %	0,74 %	0,95 %	4,29 %	3,11 %	2,91 %	3,54 %
4	Ct	-	-	-	29,2	28,7	28,6	28,9
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	2,96 %	2,90 %	2,76 %	3,04 %
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	VK (%)	1,52 %	1,59 %	3,43 %	N/A	N/A	N/A	N/A

Tab. 20: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Tests für *ipaH* aus Stuhlproben (RIDA®UNITY System).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter-Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	25,0	24,8	24,6	25,3	25,1	25,1	25,2
	VK (%)	1,02 %	1,11 %	1,09 %	1,84 %	1,73 %	1,83	1,80 %
2	Ct	26,2	26,1	26,0	26,3	26,1	26,2	26,2
	VK (%)	0,81 %	0,89 %	0,90 %	1,49 %	1,39 %	1,37 %	1,40 %
3	Ct	25,5	25,3	25,4	26,2	26,1	26,1	26,1
	VK (%)	0,96 %	0,99 %	0,87 %	1,72 %	1,57 %	1,53 %	1,61 %
4	Ct	-	-	-	27,1	27,0	27,0	27,0
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	1,44 %	1,34 %	1,45 %	1,42 %
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	VK (%)	0,88 %	0,77 %	0,69 %	N/A	N/A	N/A	N/A

Tab. 21: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Tests für *ipaH* aus Stuhlproben (CFX96™ Dx).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter-Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	25,1	25,0	24,8	24,4	24,4	24,4	24,4
	VK (%)	1,15 %	1,25 %	1,06 %	1,49 %	1,79 %	1,70 %	1,67 %
2	Ct	25,2	25,2	25,2	25,4	25,3	25,4	25,4
	VK (%)	0,85 %	1,03 %	1,01 %	1,11 %	1,21 %	1,21 %	1,17 %
3	Ct	25,2	25,0	25,0	25,4	25,4	25,3	25,4
	VK (%)	1,04 %	1,09 %	1,14 %	1,29 %	1,46 %	1,53 %	1,43 %
4	Ct	-	-	-	26,2	26,1	26,1	26,2
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	1,27 %	1,45 %	1,36 %	1,36 %
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	VK (%)	0,89 %	0,53 %	0,70 %	N/A	N/A	N/A	N/A

Tab. 22: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Tests für eae aus Stuhlproben (RIDA®UNITY System).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	26,2	26,3	26,0	26,4	26,5	26,5	26,5
	VK (%)	0,93 %	0,86 %	0,85 %	1,92 %	1,95 %	2,03 %	1,97 %
2	Ct	27,7	27,9	27,7	27,9	28,0	28,0	27,9
	VK (%)	0,86 %	0,92 %	0,77 %	1,85 %	1,76 %	1,75 %	1,78 %
3	Ct	27,0	27,0	27,2	27,8	27,9	27,9	27,9
	VK (%)	1,05 %	0,86 %	0,99 %	2,03 %	1,84 %	1,80 %	1,89 %
4	Ct	-	-	-	28,9	29,1	29,1	29,0
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	1,81 %	1,78 %	1,81 %	1,80 %
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	VK (%)	1,24 %	0,78 %	1,18 %	N/A	N/A	N/A	N/A

Tab. 23: Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY EHEC/EPEC Tests für eae aus Stuhlproben (CFX96™ Dx).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	26,5	26,6	26,5	26,3	26,4	26,4	26,4
	VK (%)	0,54 %	0,69 %	0,58 %	1,76 %	1,86 %	1,88 %	1,84 %
2	Ct	27,3	27,5	27,5	27,6	27,7	27,8	27,7
	VK (%)	0,68 %	0,68 %	0,65 %	1,49 %	1,70 %	1,51 %	1,59 %
3	Ct	27,3	27,4	27,4	27,6	27,8	27,8	27,7
	VK (%)	0,88 %	0,74 %	0,79 %	1,66 %	1,78 %	1,85 %	1,77 %
4	Ct	-	-	-	28,5	28,7	28,6	28,6
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	1,32 %	1,58 %	1,48 %	1,47 %
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	VK (%)	0,73 %	0,55 %	0,68 %	N/A	N/A	N/A	N/A

13.2.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR Tests wurde an einem definierten Panel an *E. coli*- und *Shigella*-Stämmen untersucht (s. Tab. 24).

Tab. 24: Analytische Reaktivitätstestung

Stamm	Ergebnis*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>E. coli</i> (<i>stx 1c, stx 2b</i>)	+	-	-
<i>E. coli</i> (<i>stx 1a, stx 2c, eae</i>)	+	-	+
<i>E. coli</i> (<i>stx 1d</i>)	+	-	
<i>E. coli</i> (<i>stx 2a, eae</i>)	+	-	+
<i>E. coli</i> (<i>stx 2d</i>)	+	-	-
<i>E. coli</i> (<i>stx2e</i>)	+	-	-
<i>E. coli</i> (<i>stx2f, eae</i>)	+	-	+
<i>E. coli</i> (<i>stx2g</i>)	+	-	-
<i>E. coli</i> O127:H6 (<i>eae alpha</i>)	-	-	+
<i>E. coli</i> O157:H7 (<i>eae gamma</i>)	-	-	+
<i>Shigella boydii</i> (<i>ipaH</i>)	-	+	-
<i>Shigella dysenteriae</i> (<i>ipaH</i>)	-	+	-
<i>Shigella flexneri</i> (<i>ipaH</i>)	-	+	-
<i>Shigella sonnei</i> (<i>ipaH</i>)	-	+	-

* + = positiv (mindestens 2 von 3 Replikaten positiv)










- = negativ

14. Versionsübersicht


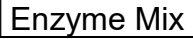


Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-06-14	Freigabeversion

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

	Reaktions-Mix
	Enzyme-Mix
	Negativkontrolle
	Positivkontrolle

16. Literatur

1. Aziz FAA, Ahmad NA, Razak MAA, Omar M, Kasim NM, Yusof M, et al. Prevalence of and factors associated with diarrhoeal diseases among children under five in Malaysia: a cross-sectional study 2016. *BMC Public Health*. 2018;18(1):1363.
2. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(12):6235-54.
3. Schuetz AN. Emerging agents of gastroenteritis: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*. *Semin Diagn Pathol*. 2019;36(3):187-92.
4. Newell DG, La Ragione RM. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transbound Emerg Dis*. 2018;65 Suppl 1:49-71.
5. Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang JY. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch Microbiol*. 2017;199(6):811-25.
6. Lagerqvist N, Löf E, Enkirch T, Nilsson P, Roth A, Jernberg C. Outbreak of gastroenteritis highlighting the diagnostic and epidemiological challenges of enteroinvasive *Escherichia coli*, County of Halland, Sweden, November 2017. *Euro Surveill*. 2020;25(9).