

RIDA® GENE EHEC/EPEC

REF PG2205



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE 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. in humanen Stuhl- und Kulturproben.^{1,2}

Die RIDA®GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch pathogene *Escherichia coli* bzw. *Shigella* spp. 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-Gene) 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.³

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 Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* werden die VTEC synonym auch als STEC bezeichnet. Ein weiterer wichtiger diagnostischer EHEC-Pathogenitätsfaktor ist neben stx1/stx2 (Shigatoxin Gene) das eae-Gen (*E. coli* attaching and effacing Gen), welches Intimin codiert. Intimin befähigt den Erreger u.a. sich an die Darmepithelzellen anzuheften. Durch den Nachweis des ipaH-Gens (invasion plasmid antigen H Gen) können EHEC/STEC gegen Shigellen/EIEC abgegrenzt werden.

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, insbesondere rohes oder nicht ausreichend erhitztes Fleisch oder Fleischprodukte und 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.^{4,5}

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

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE 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. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente der Virulenzfaktoren stx1/stx2, eae und ipaH 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 EHEC/EPEC 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 EHEC/EPEC 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.

- 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-freies Wasser)

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-Präparation aus Stuhlproben

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

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:3 mit Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 30 sec bei 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®]GENE EHEC/EPEC 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.

8.2 DNA-Präparation aus Kulturproben

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

Für die DNA-Präparation aus Kulturproben wird folgende Extraktionsmethode empfohlen: Für die Kulturproben 1 ml PCR-Wasser in ein Präparationsröhrchen vorlegen. Mit einer Impföse mehrere Kolonien sammeln und im vorgelegten PCR-Wasser suspendieren. Den Stab der Impföse abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen und 60 sec stark vortexen. Danach im Heizblock für 10 min bei 95°C unter Schütteln erhitzen. Anschließend 1 min bei 13.000 x g zentrifugieren und den Überstand als Probe einsetzen.

Hinweis: Bei starker Trübung den Zentrifugationsschritt ggf. wiederholen.

Der RIDA[®]GENE EHEC/EPEC 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-PCR-Wasser-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	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

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

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 in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

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

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

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

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

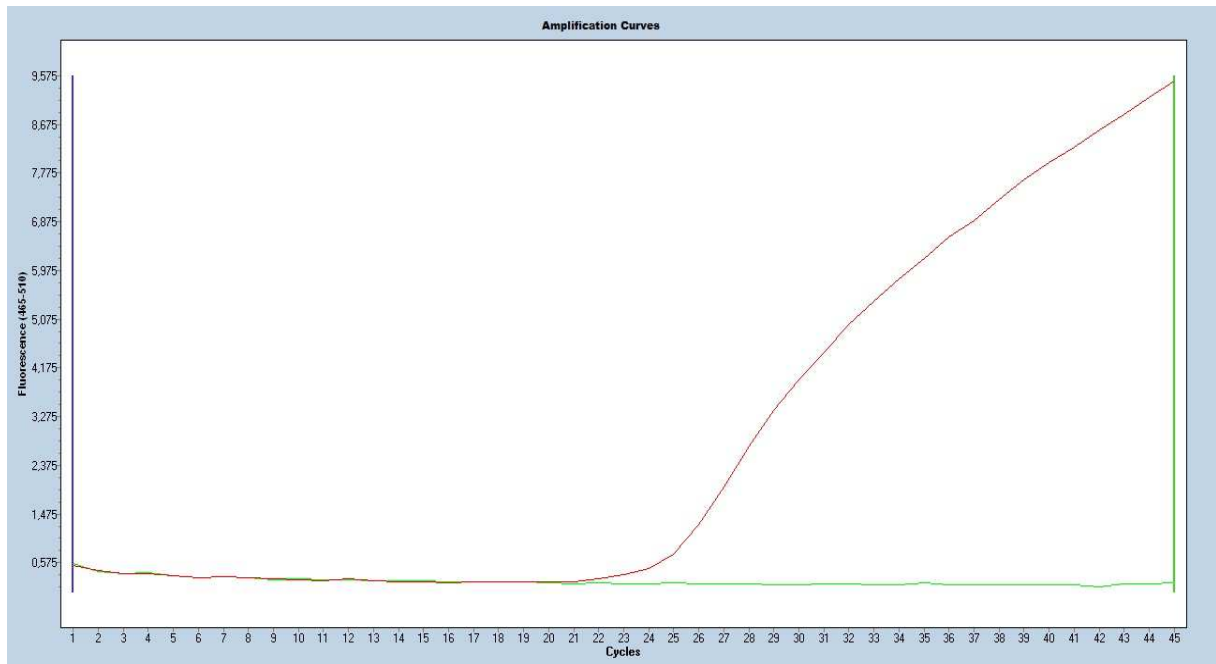


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (stx1/stx2) auf dem LightCycler® 480II

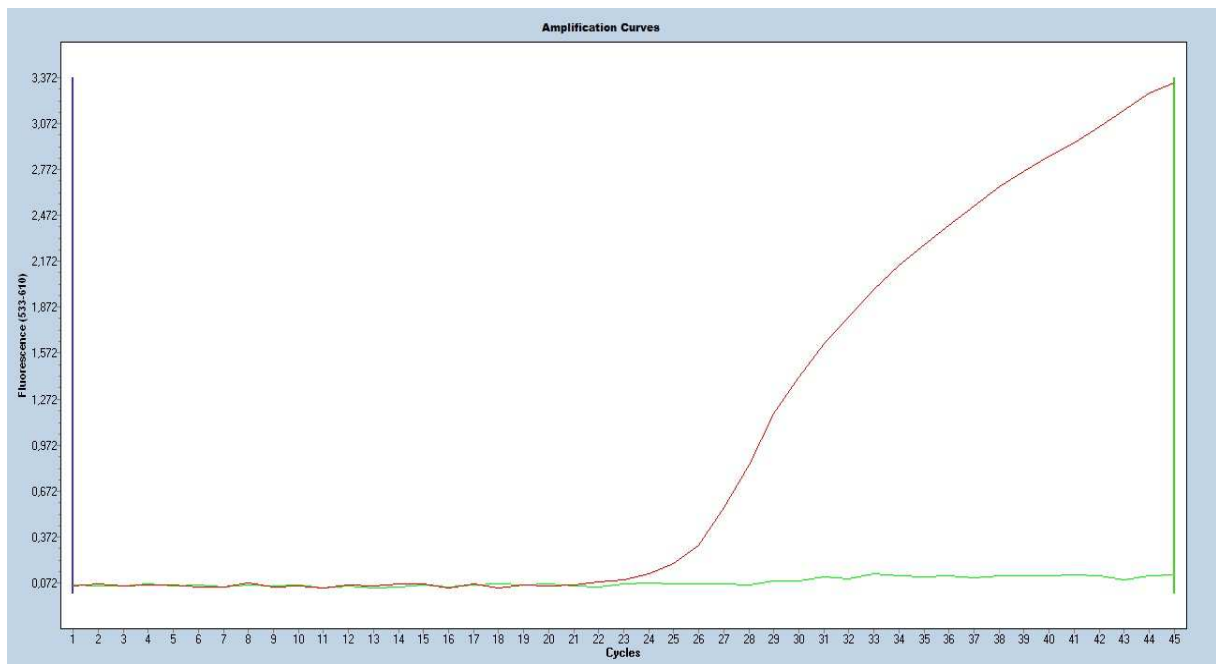


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (ipaH) auf dem LightCycler® 480II

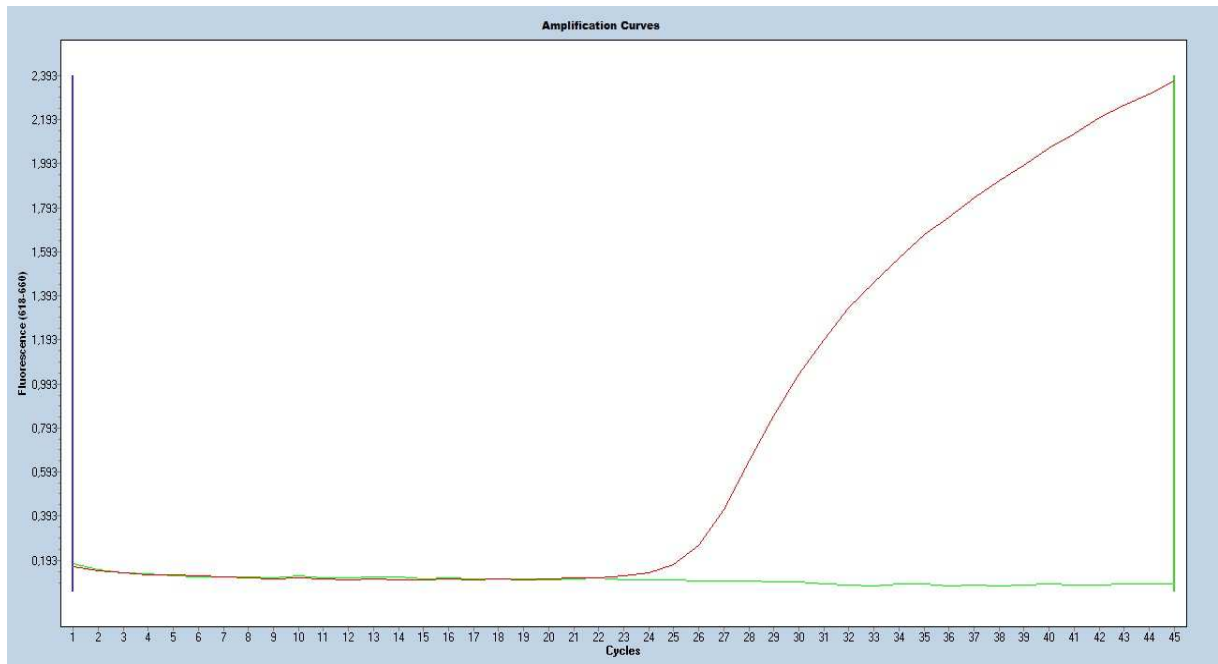


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (eae) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Interpretation der Ergebnisse

Pathogenitätsfaktor-Gene				
stx1/stx2	ipaH	eae	ICD	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	STEC (EHEC) nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	EPEC nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	STEC (EHEC) und EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	EHEC nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. und EPEC nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	EHEC und EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

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 negativ bewertet, wenn die Probe keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige Internal Control DNA positiv ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion bzw. ein Fehler im Extraktionsverfahren kann durch die Detektion der Internal Control DNA ausgeschlossen werden.

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

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Probe eine Amplifikation im Nachweissystem, jedoch keine für die Internal Control DNA zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA führen können.

Eine Probe ist nicht auswertbar, wenn die Probe und die Internal Control DNA im Nachweissystem keine Amplifikation zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhl- und Kulturproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®]GENE EHEC/EPEC 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, ipaH, eae) vorhanden sind.
8. **Mucin kann bereits in geringen Mengen interferierende Eigenschaften aufweisen.**

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®] GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien/Reaktion für stx1/stx2, ipaH und eae.

Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen Verdünnungsreihen von stx1/stx2, ipaH und eae (jeweils $10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II.

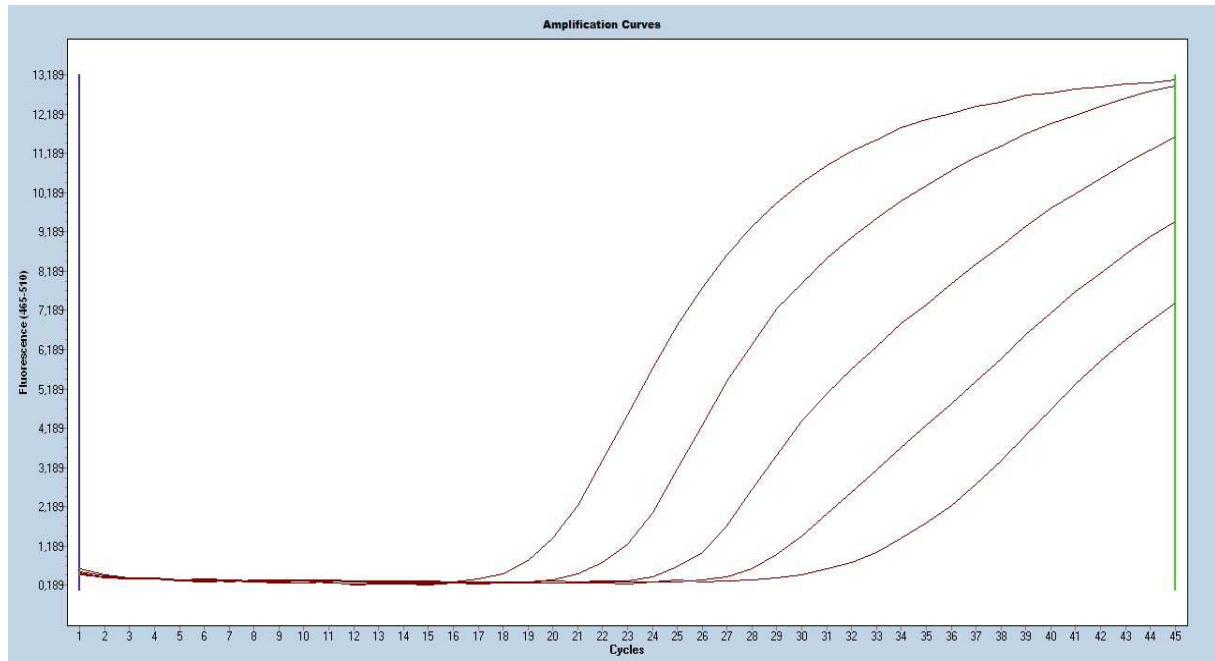


Abb. 4: Verdünnungsreihe Shigatoxin-Gene stx1/stx2 ($10^5 - 10^1$ DNA-Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

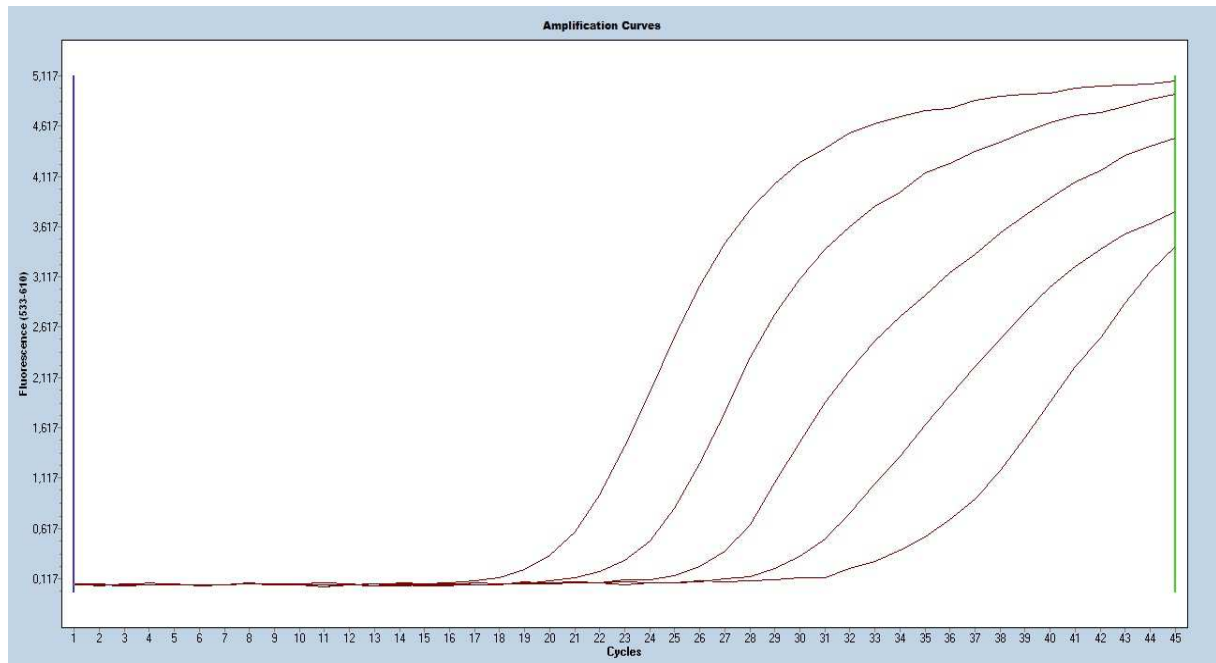


Abb. 5: Verdünnungsreihe ipaH-Gen ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler[®] 480II

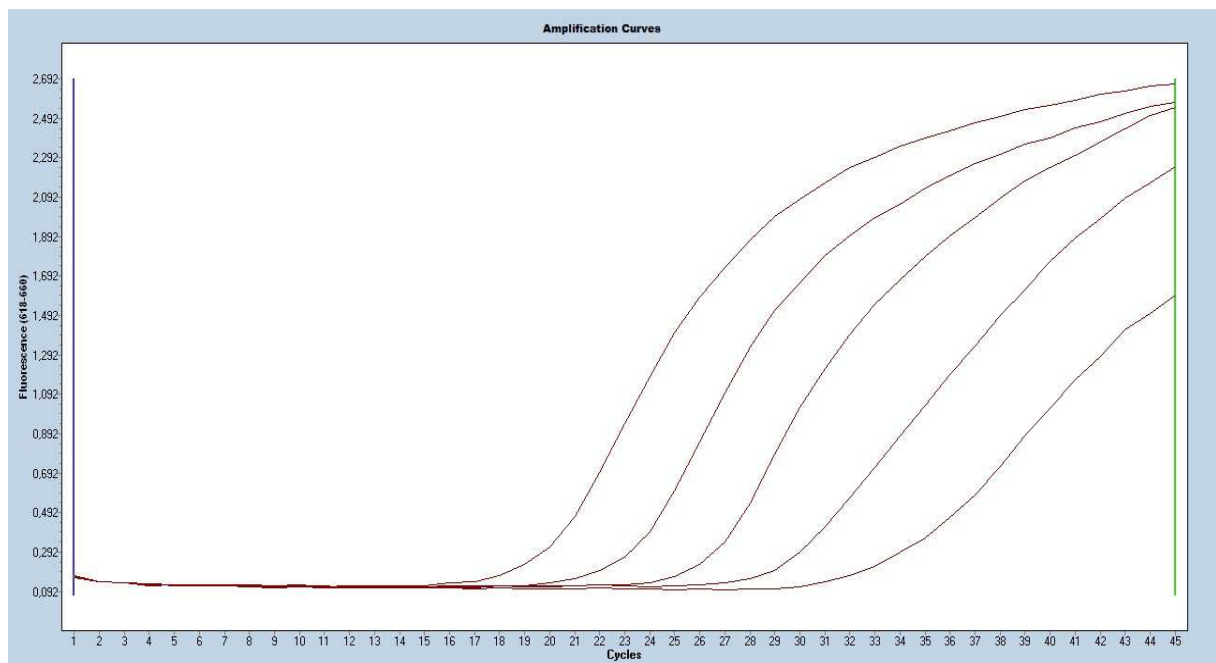


Abb. 6: Verdünnungsreihe eae-Gen ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler[®] 480II

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

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR ist spezifisch für stx1/stx2, ipaH und eae. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

Tab. 12: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus GI	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GII	-
Astrovirus 2	-	<i>Clostridium sordelli</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland1	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-				

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA[®]GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen stx1- und stx2-Subtypen sowie eae- und ipaH-Subtypen untersucht (s. Tab. 13). Folgende Untereinheiten wurden mit der RIDA[®]GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR nachgewiesen:

Tab.13: Analytische Reaktivitätstestung










stx1-Subtypen					
stx1a	+	stx1c	+	stx1d	+
stx2-Subtypen					
stx2a	+	stx2d	+	stx2g	+
stx2b	+	stx2e	+		
stx2c	+	stx2f	+		
ipaH-Subtypen					
<i>Shigella boydii</i>	+	<i>Shigella flexneri</i>	+	<i>Shigella sonnei</i>	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+				
eae-Subtypen					
eae alpha	+	eae gamma	+		

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2014-08-14	Freigabeversion
2018-08-24	Generelle Überarbeitung
2018-08-24	4. Packungsinhalt 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 11. Interpretation der Ergebnisse 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

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

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. 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.