


RIDA[®] GENE Hospital Stool Panel
real-time RT-PCR

Art. Nr.: PG0705
100 Reaktionen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

 -20 °C



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

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Verwendungszweck

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Hospital Stool Panel ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Norovirus (Genogruppe I und II), Rotavirus und der *Clostridium difficile* Toxin-Gene A (tcdA) und B (tcdB) in humanen Stuhlproben.

Die RIDA®GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR soll die Diagnose einer im Krankenhaus erworbenen Gastroenteritis unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Nosokomiale Diarrhöen sind im Krankenhaus erworbene Durchfallerkrankungen, die definitionsgemäß nach 72h Krankenhausaufenthalt auftreten (3-Tage Regel). Eine nosokomiale Diarrhö kann eine infektiöse oder nicht-infektiöse (z.B. Medikamente oder Chemotherapie) Ursache haben und betrifft bis zu ein Drittel der Krankenhauspatienten. Der bedeutendste und häufigste Erreger einer nosokomialen Diarrhö ist *Clostridium difficile*. Neben *Clostridium difficile* sind Noroviren und Rotaviren von besonderer Bedeutung. Nosokomiale Diarrhöen können schwerwiegende Komplikationen bei Patienten verursachen und verlängern den Krankenhausaufenthalt und erhöhen die Kosten.^{1,2,3,4}

Noroviren verursachen mit Abstand die meisten Fälle aller nicht bakteriellen Gastroenteritis-Ausbrüche.^{5,6,7} Eine durch Noroviren verursachte Gastroenteritis äußert sich durch starke Übelkeit, heftiges Erbrechen und schweren Durchfall. Noroviren werden sowohl mit dem Stuhl als auch mit dem Erbrochenen ausgeschieden. Eine aerogene Übertragung durch Bildung virushaltiger Aerosole ist häufig die Ursache einer sehr raschen Ausbreitung in Gemeinschaftseinrichtungen.^{8,9,10} Das Center for Disease Control (CDC, Atlanta, USA) schätzt, dass jedes Jahr in den USA durch Noroviren über 21 Millionen Fälle von akuter Gastroenteritis, 70.000 Krankenhausaufenthalte und 800 Todesfälle verursacht werden.¹¹

Noroviren sind kleine, unbehüllte Viren mit einer einzelsträngigen RNA (ssRNA). Sie lassen sich in 5 Genogruppen mit derzeit 29 Genotypen und einer Vielzahl von Stämmen unterteilen. Als humanpathogen sind bisher nur Vertreter aus der Genogruppe I (GGI) mit 8 Genotypen und aus der Genogruppe II (GGII) mit 17 Genotypen beschrieben. Die restlichen 4 Genotypen verteilen sich auf die Genogruppen III bis V.

Rotaviren gehören zur Familie der Reoviridae. Es handelt sich dabei um unbehüllte ikosaedrischen doppelsträngige RNA (dsRNA) Viren. Man unterscheidet sieben Serogruppen (A - G). Humanpathogene Rotaviren sind in den Serogruppen A - C enthalten, wobei mehr als 90 % der Infektionen durch Rotaviren der Serogruppe A verursacht werden.¹²

Die Symptome einer Rotavirus-Infektion sind meist Erbrechen, Durchfall und Abdominalschmerzen. Das Virus wird fäkal-oral, besonders durch Schmierinfektionen übertragen. Rotavirus ist bei Kindern unter fünf Jahren die Hauptursache einer Diarrhö und weltweit verantwortlich für den Tod von schätzungsweise 611.000 Kindern jährlich.¹³

Die Erstbeschreibung von *Clostridium difficile*, eines gram-positiven sporenbildenden anaeroben Bakteriums, erfolgte 1935 durch Hall und O'Toole, die die Darmflora gesunder Säuglinge untersuchten.¹⁴ Erst in den späten 1970er wurde *Clostridium difficile* als Erreger der Antibiotika-assoziierten Diarrhö sowie der pseudomembranösen Kolitis identifiziert.¹⁵ Heute ist *Clostridium difficile* einer der häufigsten Erreger der nosokomialen Diarrhö.

Clostridium difficile ist die Hauptursache bei 15-25% aller Patienten mit Antibiotika-assoziierten Diarrhö und bei fast allen Patienten mit pseudomembranöser Kolitis.¹⁶ Prädisponierende Risikofaktoren für eine *Clostridium difficile* assoziierte Diarrhö sind z.B. Antibiotikatherapie, Alter des Patienten, sowie Länge und Anzahl der Krankenhausaufenthalte. Zunehmend erkranken aber auch nicht Antibiotika-therapierte und nicht hospitalisierte Patienten an einer *Clostridium difficile* Infektion. Die Krankheitssymptome reichen von leichten Durchfällen über Darmentzündungen unterschiedlicher Schwere bis hin zur pseudomembranösen Kolitis, der schwersten Form der Antibiotika-assoziierten Diarrhö. Die klinische Symptomatik wird durch toxische Stämme von *Clostridium difficile*, die das Toxin A und Toxin B produzieren, hervorgerufen. In den letzten Jahren stiegen Anzahl und Schwere der Erkrankungen weltweit an.¹⁷

Die real-time RT-PCR erlaubt einen schnellen hochsensitiven und spezifischen Nachweis für die Ursache einer infektiösen Diarrhö. Eine frühe und zuverlässige Diagnose des Diarrhö verursachenden Erregers ermöglicht eine schnelle spezifische Behandlung des Krankenhauspatienten und die Einleitung von Hygienemaßnahmen, um eine nosokomialen Übertragung zu verhindern.

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Norovirus (Genogruppe I und II), Rotavirus und der *Clostridium difficile* Toxin-Gene A (tcdA) und B (tcdB) in humanen Stuhlproben.

Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR Format, d.h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA (Norovirus, Rotavirus) wird dabei mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die spezifischen Genfragmente (für Norovirus GGI und GGII, Rotavirus und *Clostridium difficile* Toxin A und B) werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen (Norovirus: ORF1/ORF2 junction Region, Rotavirus: NSP3 Gen, *Clostridium difficile* Toxin A/B: tcdA/tcdB) 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 optischen Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x 700 µl	gelb
2	PP-Mix	1x 770 µl	grün
3	Enzyme Mix	1x 80 µl	rot
R	Internal Control RNA	2x 1800 µl	braun
N	PCR Water	1x 500 µl	weiß
P	Positive Control	1x 100 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 5 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 Hospital Stool Panel real-time RT-PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:
 - Extraktionsplattformen:
 - RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)
 - Maxwell[®] 16 (Promega)
 - Real-time PCR-Gerät:

Roche:	LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies:	Mx3005P
Applied Biosystems:	ABI7500
Abbott:	m2000rt
Bio-Rad:	CFX96 [™]
Cepheid:	SmartCycler [®]
QIAGEN:	Rotor-Gene Q

Bemerkung: 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 I (PG0001) bei Verwendung des LightCycler[®] 480II
- 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

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 Test 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 Material Safety Data Sheets (MSDS) unter www.r-biopharm.com

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA/RNA-Isolierung aus Stuhlproben

Für die DNA/RNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches RNA-Extraktionskit (z.B. z.B. RIDA[®] Xtract) oder RNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] 16 (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 Hospital Stool Panel Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt.

Wird die Internal Control RNA (ICR) nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICR dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 3).

Wird die Internal Control DNA (ICR) als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICR während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICR soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden.

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 Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Wir empfehlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 2, Tab. 3). Vor der Benutzung den Reaction Mix, den PP-Mix, die Positive Control, das PCR Water und die Internal Control RNA auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 2: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix (Primer-Probe-Mix)	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20,1 µl	221,1 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix (Primer-Probe-Mix)	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,1 µl	232,1 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

9.2 Herstellung des RT-PCR Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl PCR Water zum vorgelegten Master-Mix als Negativkontrolle pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der ICR als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und die Inhibitionskontrolle je 1 µl der ICR zum RT-PCR Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: Je 5 µl RNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl Positive Control zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der ICR als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und die Inhibitionskontrolle je 1 µl der ICR zum RT-PCR Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz abzentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die RT-PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 4).

9.3 Geräteeinstellungen

Tab. 4: Real-time RT-PCR Profil

Reverse Transkription	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
PCR Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 55 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Bemerkung: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 bis 4 auf 5.0 eingestellt werden. In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 individuell eingestellt werden müssen.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 5: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	618/660	
Cepheid SmartCycler®	Norovirus	Kanal 1	Stellen Sie die „Man. Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 bis 4 auf 5.0 *
	ICR	Kanal 2	
	Rotavirus	Kanal 3	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Kanal 4	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
Abbott m2000rt	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein
	ICR	Yellow	
	Rotavirus	Orange	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Red	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	

*In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 individuell eingestellt werden müssen.

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 6, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die Positivkontrolle 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. 6: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
PTC	Positiv	NA ^{*1}	Siehe Quality Assurance Certificate
NTC	Negativ	Ct > 20	0

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

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

Wenn die Negativkontrolle (NTC) nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Negativkontrolle 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 Positiv- und Negativkontrolle (Norovirus) auf dem LightCycler® 480II

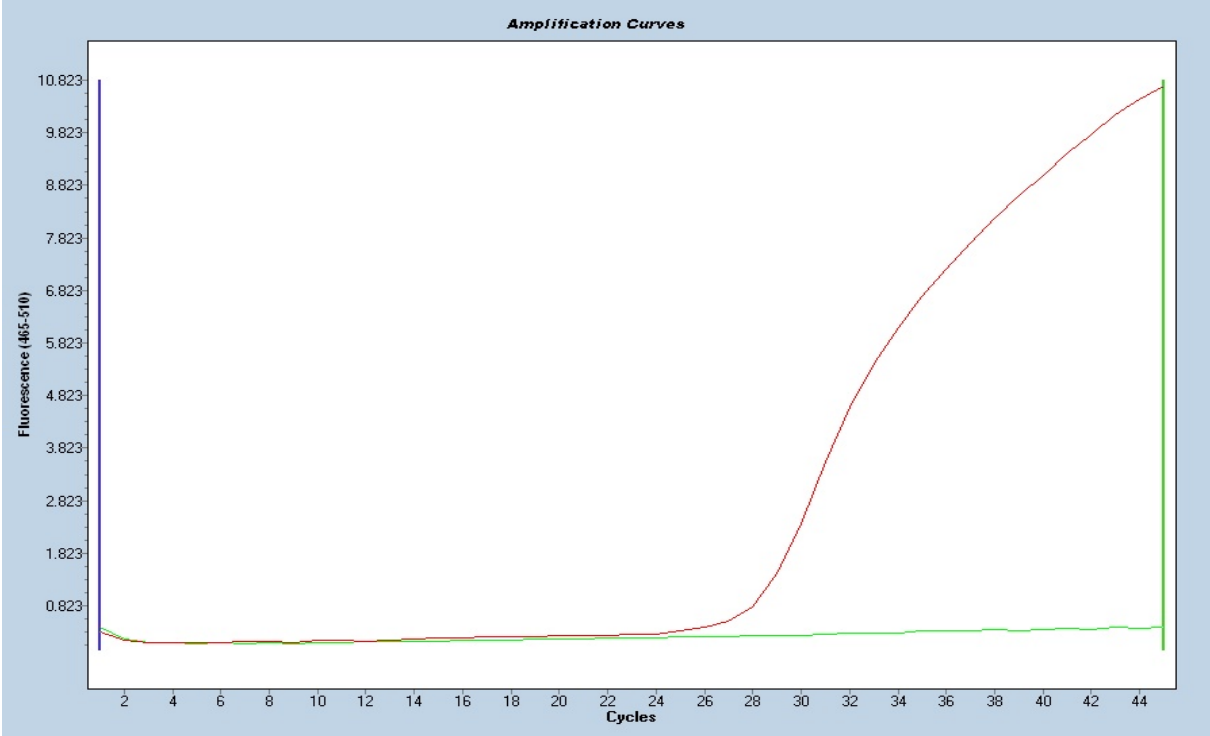


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Rotavirus) auf dem LightCycler® 480II

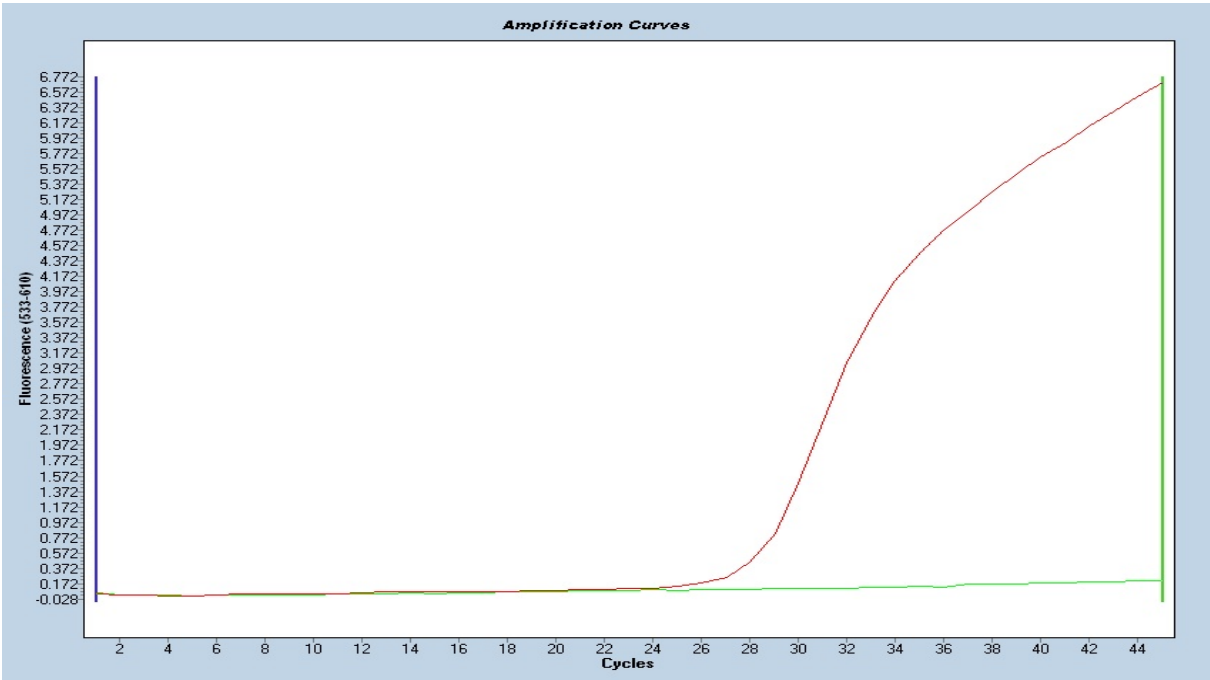
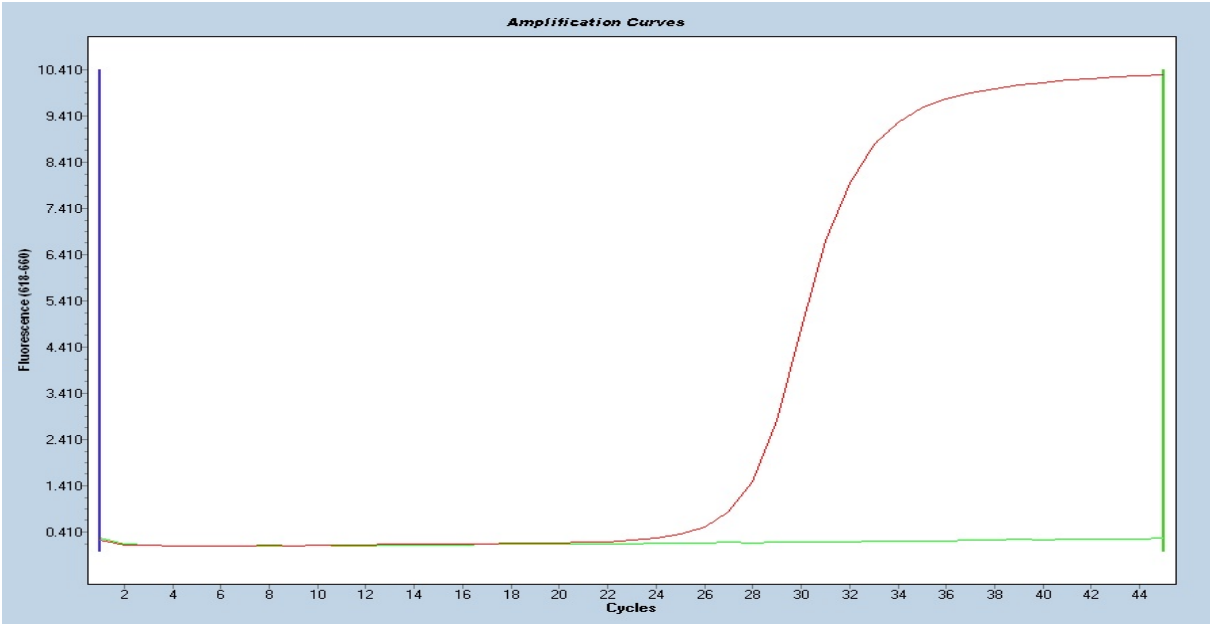


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (*Clostridium difficile* Toxin A/B Gene) auf dem LightCycler® 480II



11. Auswertung und Interpretation

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 7.

Tab. 7: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis				
Norovirus	Rotavirus	<i>C.difficile</i> Toxin A/B Gene	ICR	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	Norovirus nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	Rotavirus nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	Norovirus, Rotavirus nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	Rotavirus, <i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	Norovirus, <i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	Norovirus, Rotavirus, <i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene sind nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

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

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Probe und die dazugehörige Internal Control RNA (ICR) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

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

Eine Probe ist nicht auswertbar, wenn die Proben und die Internal Control RNA (ICR) 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 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 Viruslast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in der Primer- oder Sondenbindungsregion können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Noroviren der Genogruppe IV, die in sehr seltenen Fällen auch Menschen infizieren können, werden ebenfalls mit dem RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel Test nachgewiesen.
7. Rotaviren der Serogruppe B und C werden nicht mit dem RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel Test nachgewiesen.
8. 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.
9. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die entsprechenden Zielgene vorhanden sind.

13. Testmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze ≥ 50 RNA-Kopien/Reaktion für Norovirus, von ≥ 50 RNA-Kopien/Reaktion für Rotavirus und von ≥ 10 DNA-Kopien/Reaktion für *C. difficile* Toxin-Gene A und B (s. Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6).

Abb. 4: Verdünnungsreihe Norovirus (10^5 - 10^1 RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

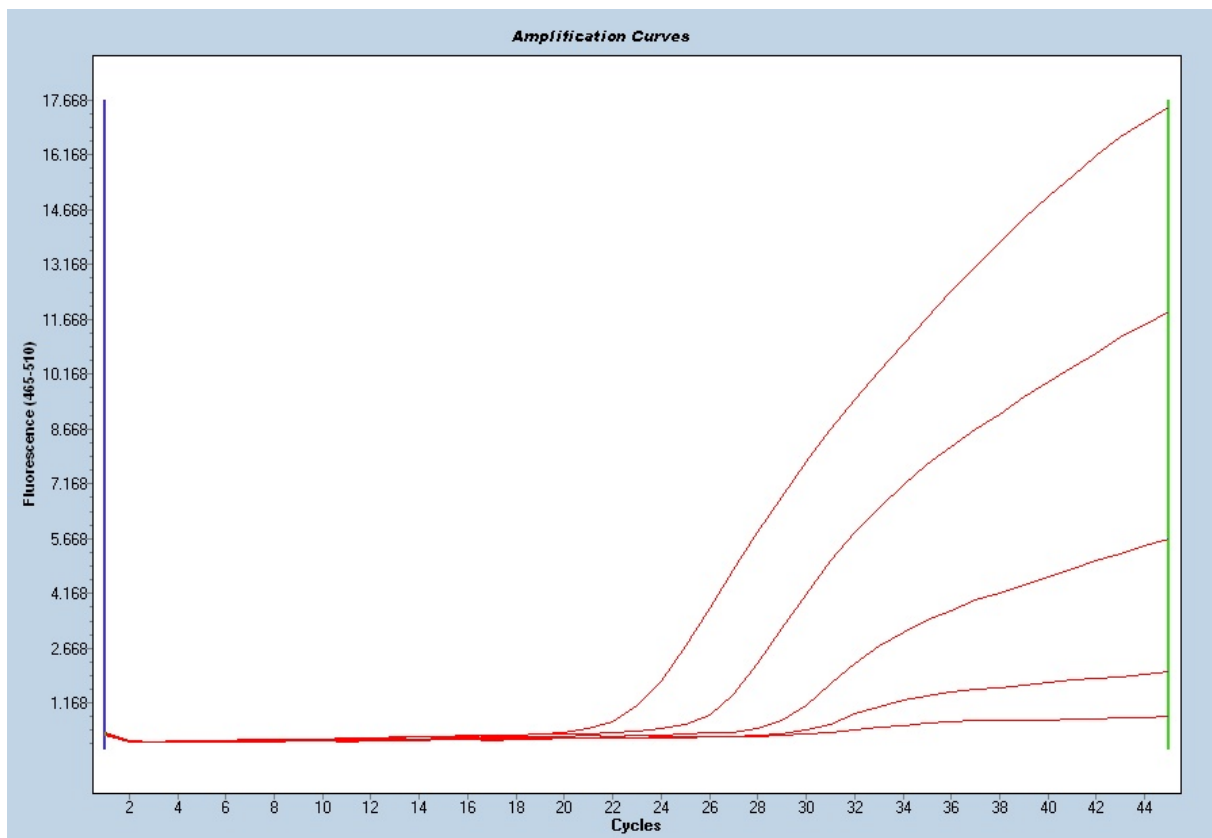


Abb. 5: Verdünnungsreihe Rotavirus (10^5 - 10^1 RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

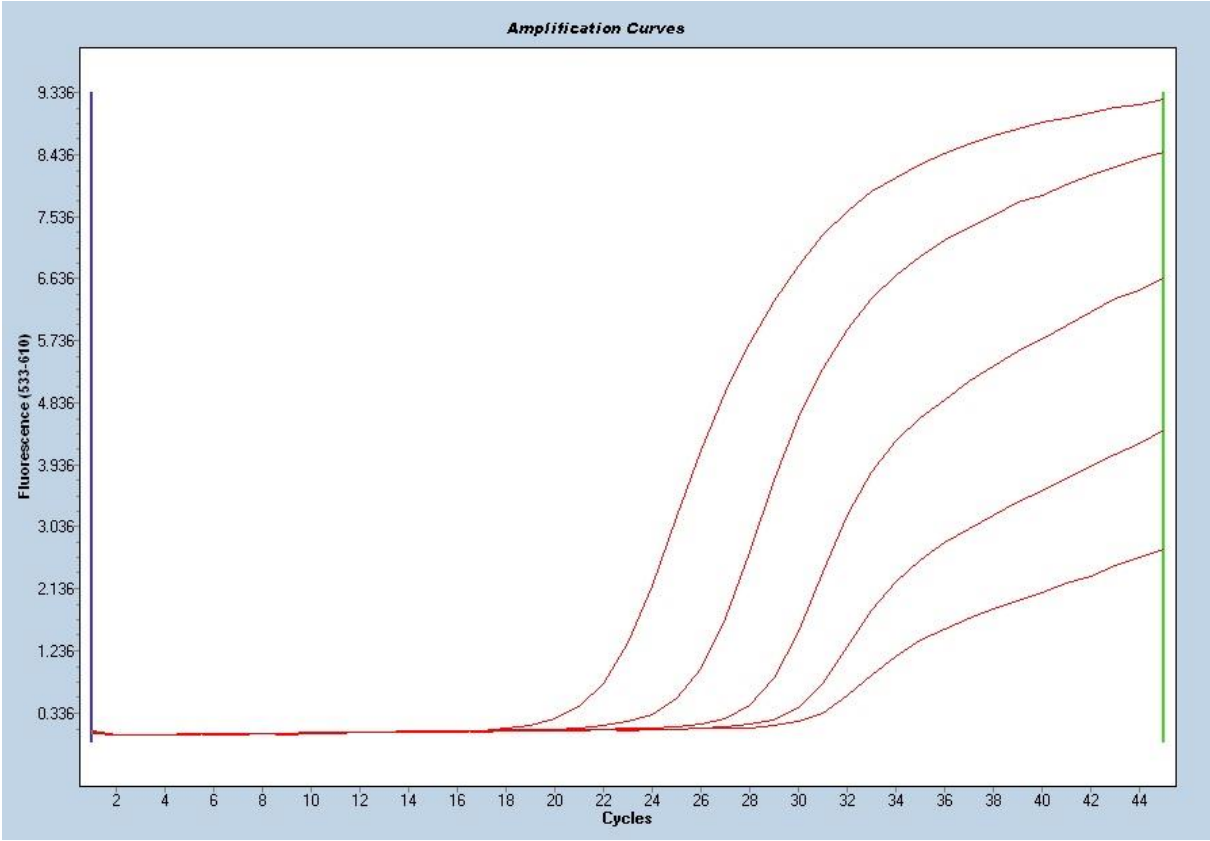
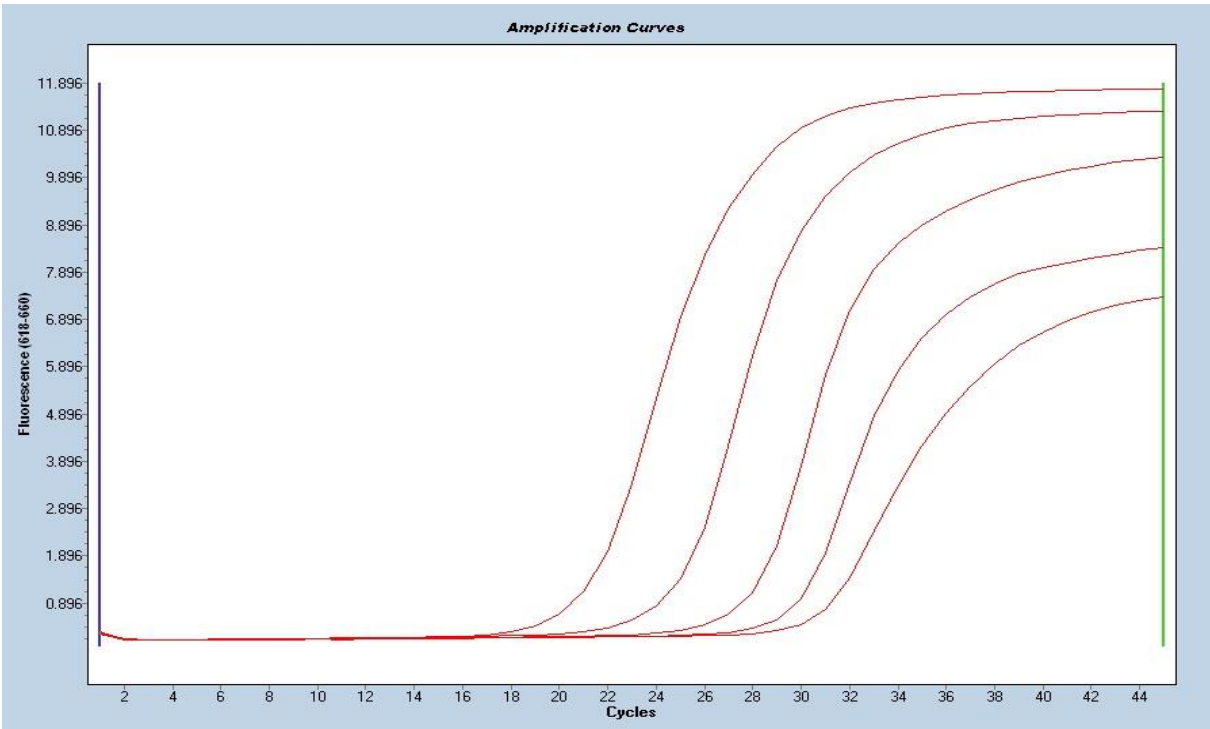


Abb. 6: Verdünnungsreihe *Clostridium difficile* Toxin A/B Gene (10^5 - 10^1 DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II



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

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA[®] GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Norovirus (Genogruppe I und II), Rotavirus und *Clostridium difficile* Toxin A und B. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 8):

Tab. 8: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Adenovirus 40, Human, Strain Dugan	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	Giardia lamblia	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Giardia intestinalis Portland 1	-		
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Giardia intestinalis WB Clone C6	-		
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	Klebsiella oxytoca	-		
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-		
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-		
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. Fetus	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-		
<i>Campylobacter lari</i> subsp. Lari	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-		
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Shigella flexneri</i>	-		
<i>Candida albicans</i>		Entamoeba histolytica	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-		
Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	-	Adenovirus 7, Human, Strain Gomen	-				

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA[®] GENE Hospital Stool Panel real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Genotypen der Norovirus Genogruppe I, II und IV und verschiedenen Serotypen der Rotavirus Spezies A untersucht (s. Tab. 9, Tab. 10). Alle Norovirus Genotypen und Rotavirus Serotypen des Probenpanels wurden mit der RIDA[®] GENE Hospital Stool Panel real-time RT-PCR nachgewiesen.

Tab. 9: Analytische Reaktivitätstestung - Norovirus

Norovirus Genogruppe I					
GGI.1	+	GGI.4	+	GGI.7	+
GGI.2	+	GGI.5	+	GGI.8	+
GGI.3	+	GGI.6	+		
Norovirus Genogruppe II					
GGII.1	+	GGII.4	+	GGII.7	+
GGII.2	+	GGII.4 Sydney 2012	+	GGII.10	+
GGII.3	+	GGII.6	+		
Norovirus Genogruppe IV					
GGIV.1	+				

Tab. 10: Analytische Reaktivitätstestung – Rotavirus

Rotavirus Serogruppe A			
Serotyp (getestete Anzahl)		Serotyp (getestete Anzahl)	
G1 (4)	+	G12 (4)	+
G2 (3)	+	P[8] (14)	+
G3 (2)	+	P[4] (3)	+
G4 (3)	+	P[8] P[4] (1)	+
G9 (4)	+		

Literatur

1. Polage CR, Solnick JV and Cohen SH. Nosocomial Diarrhea: Evaluation and Treatment of Causes Other Than *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2012.
2. Bartel B and Gau E. Nosocomial diarrhea: a review of pathophysiology, etiology, and treatment strategies. *Hosp Pract* 2012; 40(1):130-138.
3. Weis S and Grimm M. Nosokimiale Diarrhö. *Internist* 2011; 51:167-178.
4. Pawlowski SW , Warren CA and Guerrant R. Diagnosis and Treatment of Acute or Persistent Diarrhea. *Gastroenterology* 2009 ; 136(6): 1874–1886.
5. Mead PS, et al. Food- related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:607-625.
6. Glass RJ, et al. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S254-261.
7. Evan HS, General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996. *Commun Dis Public Health* 1:165-171.
8. Johnston CP, et al. Outbreak management and implications of a nosocomial Norovirus outbreak. *CID* 2007; 45:534-540.
9. Corwin AL, et al. Shipboard impact of a probable Norwalk virus outbreak from coastal Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(6)898-903.
10. Kaplan JE, et al. An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home: demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* 1982; 116:940-948.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
12. Wilhelmi I et al. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol infect* 2003, 9: 247-262.
13. Parashar UD, et al. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2): 304-306.
14. Hall IC and O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935, 49: 390–402.
15. Bartlett JG, et al. Antibiotica-associated pseudomembranous colitis due to a toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 1978; 298:531-543.
16. Bartlett JG and Gerding DN. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *CID* 2008, 46: S12-18.
17. Bartlett JG. Narrative Review: The new Epidemic of *Clostridium difficile* - Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.