



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com


www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

RIDA[®]GENE EHEC/EPEC
real-time PCR

Art. Nr.: PG2205
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 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 aus 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 Erleuterung 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 Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* werden die VTEC synonym auch als STEC bezeichnet. Ein weiterer wichtiger diagnostischer EHEC Pathogenitätsfaktor ist neben stx1/stx2 (Shiga-Toxin Gene) das eae-Gen (*E. coli* attaching and effacing Gen), welches Intimin codiert. Intimin befähigt den Erreger u.a. sich an die Darmepithelzellen anzuheften. 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, besonders rohes oder nicht ausreichend erhitztes Fleisch oder Fleischprodukte, nicht pasteurisierte Roh- oder Vorzugsmilch sowie kontaminierte Obst und Gemüseprodukte. Aber auch Infektionsketten von Mensch zu Mensch, besonders in Gemeinschaftseinrichtungen wie Kindergärten, Altenheimen oder Krankenhäusern, sowie direkte Kontakte zu Tieren sind von Bedeutung.^{4,5}

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) verursachen vor allem bei (Klein-) Kindern Durchfallerkrankungen. Der EPEC Pathogenitätsfaktor ist 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 1100 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x 11 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x 1800 µl	orange
N	PCR Water	1x 500 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 real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:
- Extraktionsplattformen:
 - RIDA® Xtract (R-Biopharm)
 - Maxwell®16 (Promega)
 - NucliSENS® easyMag™ (bioMérieux)
 - MagNA Pure LC2.0 (Roche)
 - M24sp (Abbott)
- Real-time PCR-Gerät:

Roche:	LightCycler® 480II
Agilent Technologies:	Mx3005P
Applied Biosystems:	ABI 7500
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-Isolierung aus Stuhlproben

Für die DNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit (z.B. RIDA[®] Xtract) oder DNA-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 3.000 rpm zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®]GENE EHEC/EPEC Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

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

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

8.2 DNA-Isolierung aus Kulturproben

Für die DNA-Isolierung aus Kulturproben wird folgende Isolierungsmethode empfohlen: In ein Präparationsröhrchen 1 ml A. dest (DNase frei) geben. Mit einer Impföse mehrere Kolonien sammeln und im A. dest (DNase frei) suspendieren. Den Stab der Impföse abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen und 60 Sekunden stark vortexen. Danach im Heizblock für 10 Minuten bei 95°C unter Schütteln erhitzen. Anschließend bei 12.000 rpm 1 min 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 (ICD), die entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

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

Wird die Internal Control DNA (ICD) als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICD während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICD 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.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 2, Tab. 3). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, das **PCR Water** und die **Internal Control DNA** 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 (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

Tab. 3: 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	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren

9.2 Herstellung des 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 ICD als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** die Inhibitionskontrolle je 1 µl der ICD zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: Je 5 µl DNA-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 ICD als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** die Inhibitionskontrolle je 1 µl der ICD zum 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 PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 4, Tab. 5).

9.3 Geräteeinstellungen

Tab. 4: Real-time PCR Profil für LightCycler® 480II, SmartCycler® und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
PCR Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °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 Man. Grenzwert Fluor. Einheiten für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 - 4 auf 5.0 eingestellt werden. In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 und individuell eingestellt werden müssen.

Tab. 5: Real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI 7500, m2000rt und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
PCR Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

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

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	stx1/stx2	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICD	533/580	
	ipaH	533/610	
	eae	618/660	
Cepheid SmartCycler®	stx1/stx2	Kanal 1	Stellen Sie die „Man. Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 bis 4 auf 5.0 ein *
	ICD	Kanal 2	
	ipaH	Kanal 3	
	eae	Kanal 4	
ABI 7500	stx1/stx2	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Abbott m2000rt	stx1/stx2	FAM	-
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	stx1/stx2	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	stx1/stx2	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	ipaH	Orange	
	eae	Red	
Bio-Rad CFX96™	stx1/stx2	FAM	-
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	

* In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 und 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. 7, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die Positivkontrolle liegt in einer Konzentration von 10^2 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^2 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 7: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
PTC	Positiv	NA * ¹	Siehe QAC
NTC	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 (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 (stx1/stx2) auf dem LightCycler[®] 480II

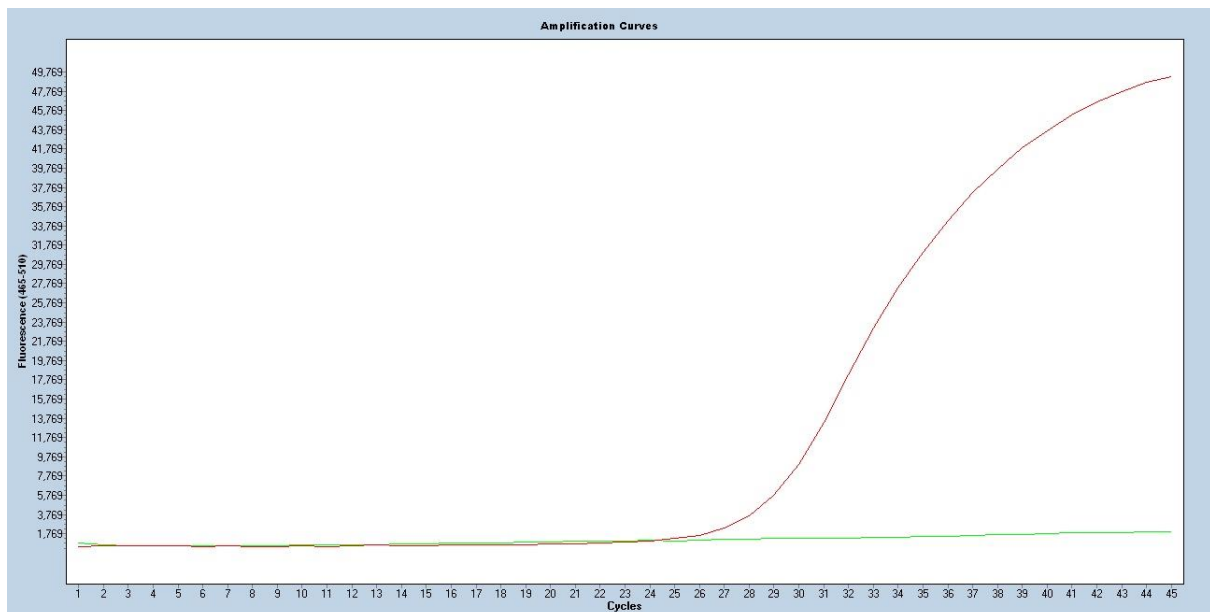


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (eae) auf dem LightCycler® 480II

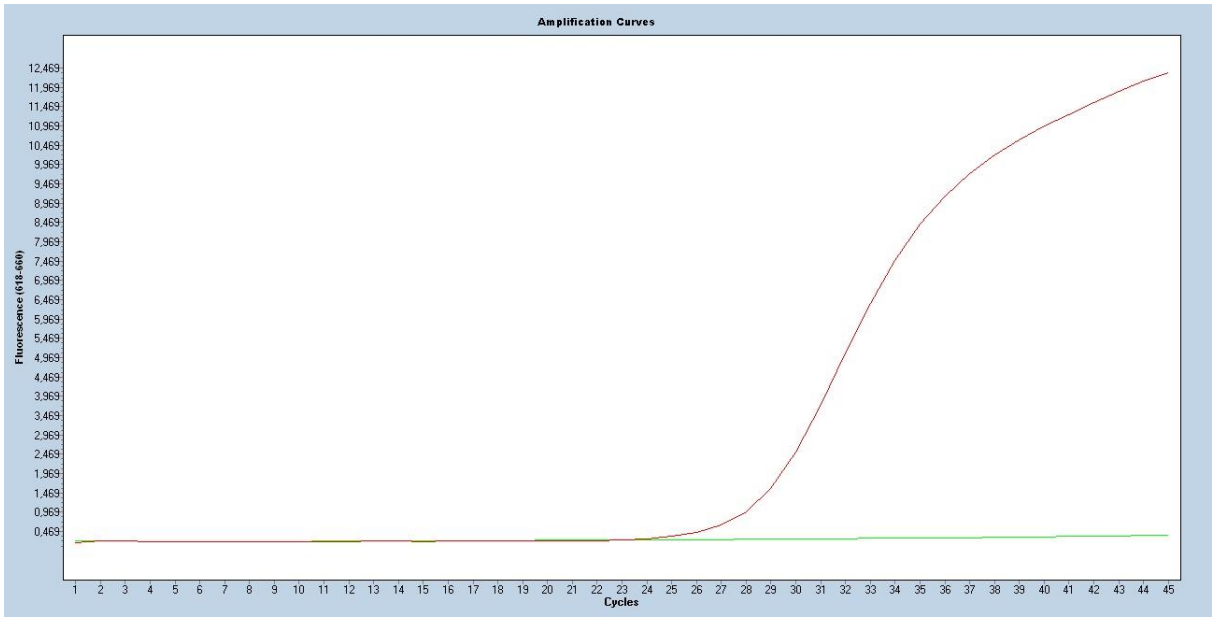
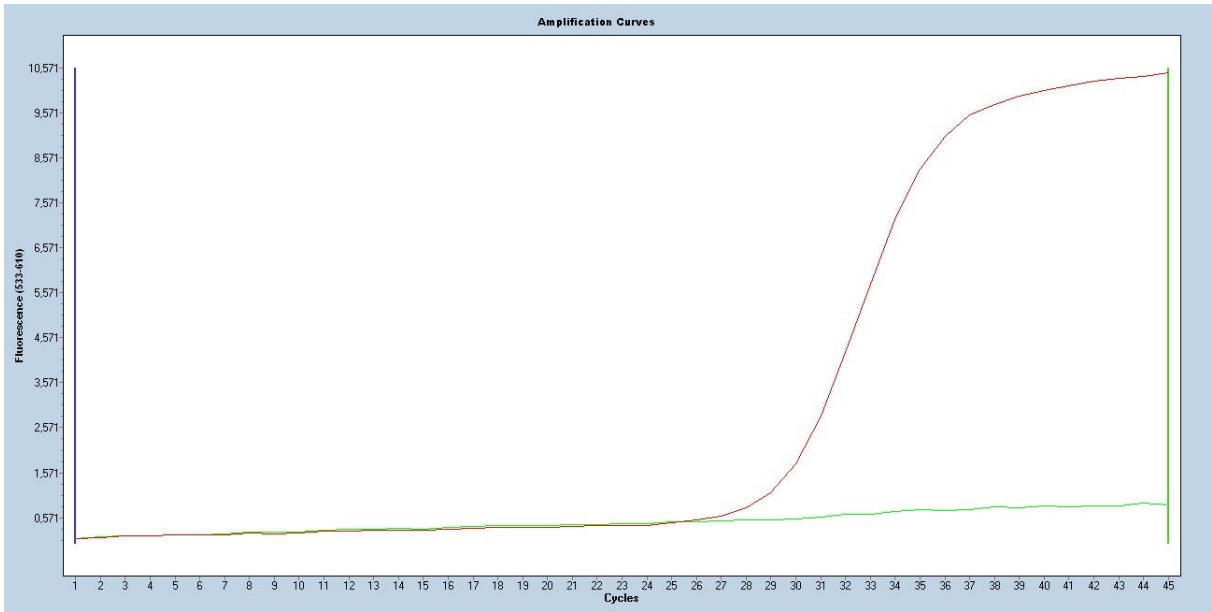


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (ipaH) auf dem LightCycler® 480II



11. Auswertung und Interpretation

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse

Pathogenitätsfaktor-Gene				
stx1/stx2	eae	ipaH	ICD	Ergebnis
positiv	positiv	negativ	Positiv	EHEC
positiv	negativ	negativ	Positiv	STEC (EHEC)
negativ	positiv	negativ	Positiv	EPEC
negativ	negativ	positiv	Positiv	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.
positiv	negativ	positiv	Positiv	<i>Shigella dysenteriae</i> Typ 1
negativ	negativ	negativ	Positiv	Negativ (Virulenzfaktor-Gene sind nicht nachweisbar)
negativ	negativ	negativ	Negativ	Nicht auswertbar

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 (ICD) positiv ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion bzw. ein Fehler im Extraktionsverfahren kann durch die Detektion der Internal Control DNA (ICD) ausgeschlossen werden.

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

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

Eine Probe ist nicht auswertbar, wenn die Probe und die Internal Control DNA (ICD) 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 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 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 Sondenbindungsregion 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 stx1/stx2-, eae- und/oder ipaH-Gene vorhanden sind.

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, eae und ipaH (s.Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6).

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

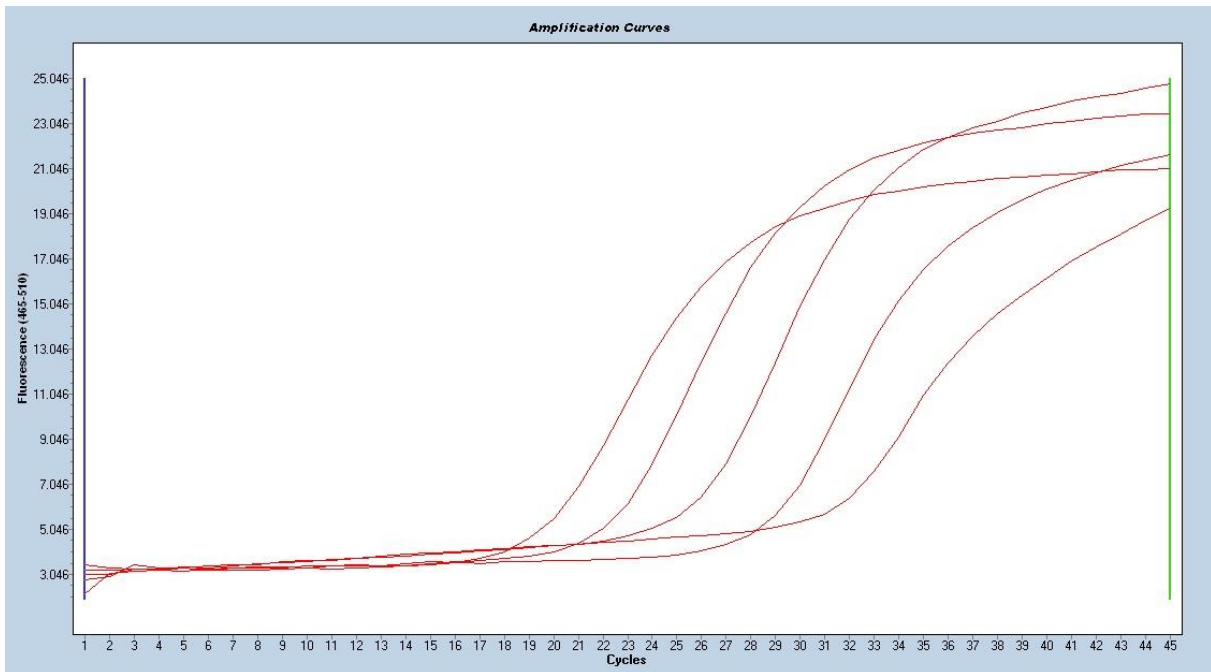


Abb. 5: Verdünnungsreihe eae-Gen ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

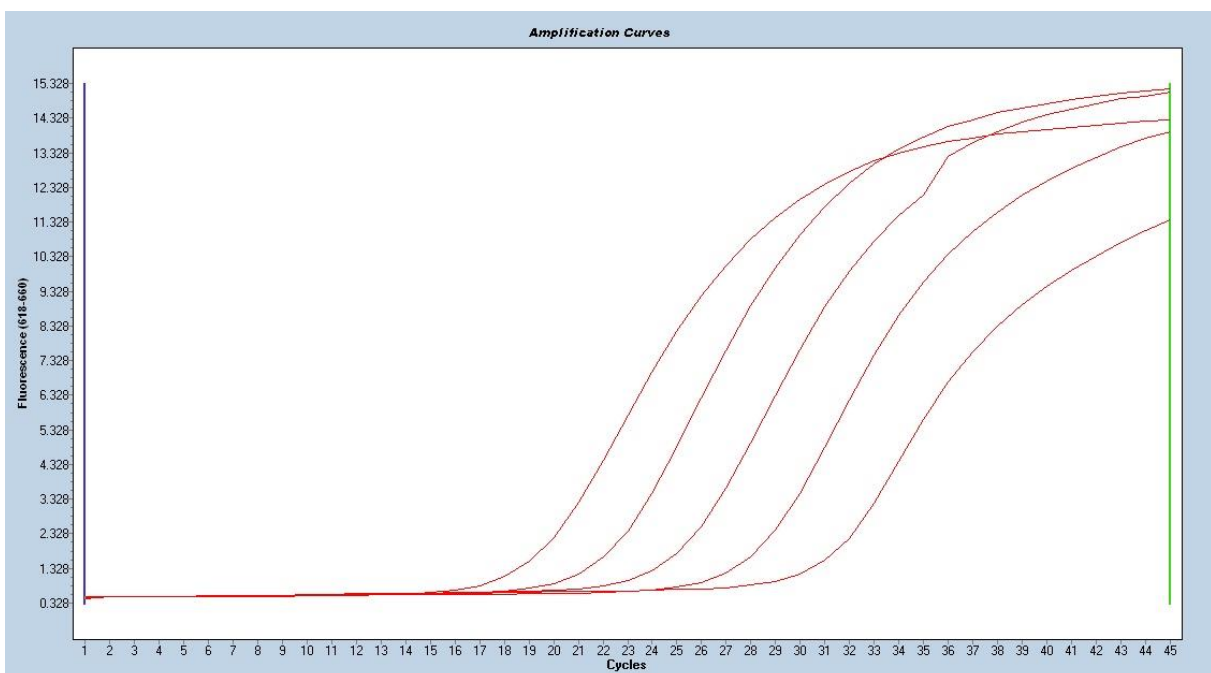
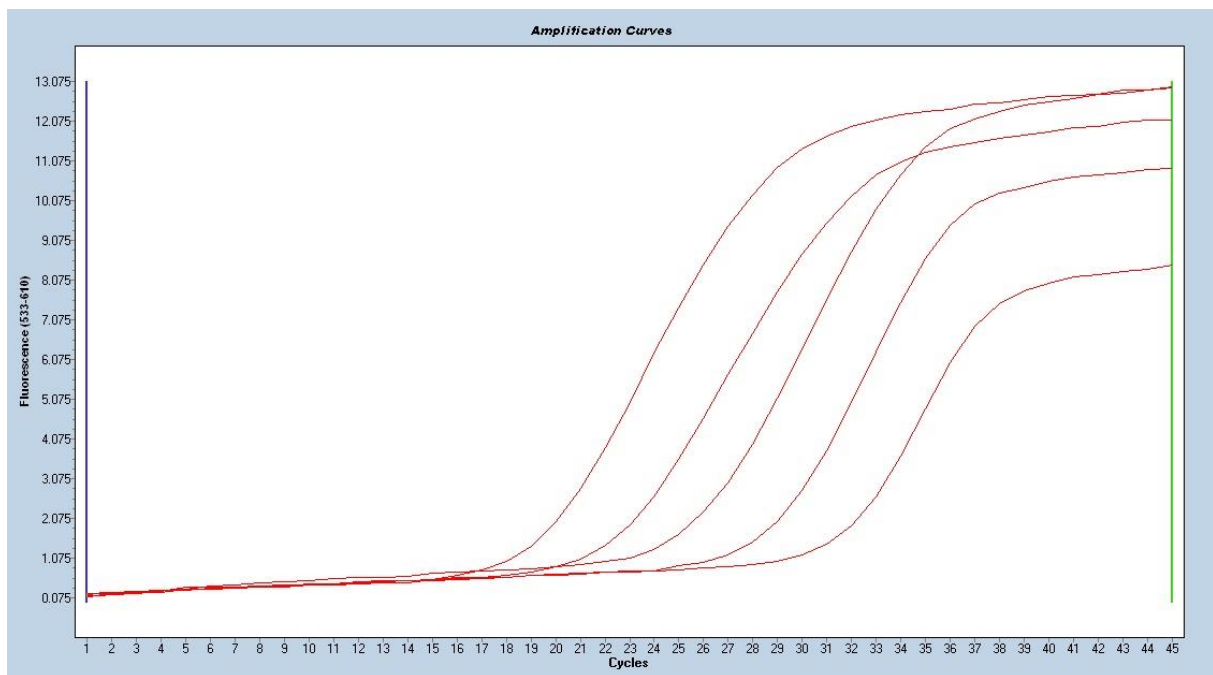


Abb. 6: Verdünnungsreihe ipaH-Gen (10^5 - 10^1 DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II



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, eae und ipaH. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 9):

Tab. 9: Kreuzreaktivitätstestung

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

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE EHEC/EPEC real-time PCR wurde mit verschiedenen *stx1* und *stx2* Subtypen untersucht (s. Tab. 10). Folgende Untereinheiten wurden mit der RIDA®GENE EHEC/EPEC real-time PCR nachgewiesen:

Tab. 10 Analytische Reaktivitätstestung

stx1 Subtypen					
stx1a	+	stx1c	+	stx1d	+
stx2 Subtypen					
stx2a	+	stx2d	+	stx2g	+
stx2b	+	stx2e	+		
stx2c	+	stx2f	+		

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.