



# 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](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

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

**RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel**  
real-time PCR

Art. Nr.: PG2405  
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 Bacterial Stool Panel ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und *Yersinia enterocolitica* aus humanen Stuhlproben.

Die RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch Bakterien verursachten gastrointestinalen Infektion unterstützen.

## 2. Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Durchfallerkrankungen sind ein wichtiges Gesundheitsproblem und verursachen weltweit ca. 2 Milliarden Fälle pro Jahr. Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind Durchfallerkrankungen die zweithäufigste Ursache von Todesfällen bei Kindern unter 5 Jahren weltweit, insbesondere in den Entwicklungsländern. Jedes Jahr sterben etwa 1,9 Millionen Kinder unter 5 Jahren an Durchfall, mehr als an AIDS, Malaria und Masern zusammen.<sup>1,2</sup> Häufige Ursachen einer bakteriellen Durchfallerkrankung sind *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Y. enterocolitica*.

*Campylobacter*-Spezies sind weltweit eine der häufigsten Ursachen einer bakteriellen Diarrhö und verantwortlich für 400 bis 500 Millionen Fälle jährlich. Die Erkrankung, die durch die Gattung *Campylobacter* verursacht wird, bezeichnet man als Campylobacteriose. Mehr als 80% der *Campylobacter*-Infektionen werden durch *C. jejuni* verursacht. Das Centers for Disease Control and Prevention (CDC) schätzt, dass jedes Jahr mehr als 2 Millionen Fälle von Campylobacteriose in den USA auftreten. 2008 berichtete das US-amerikanische Lebensmittelqualitätsprogramm „FoodNet“ eine Inzidenz von 13 diagnostizierten Fällen pro 100.000 Personen. *C. jejuni* wurde bei 5 - 16% der Kinder mit Durchfall in Industrieländern und bei 8 - 45% der Kinder mit Durchfall in Entwicklungsländern nachgewiesen.<sup>4</sup> Etwa 100 Personen mit *Campylobacter*-Infektionen versterben jedes Jahr in den USA.<sup>3,4</sup> *Campylobacter*-Infektionen erfolgen über kontaminierte Lebensmittel, insbesondere Geflügelfleisch, kontaminiertes Trinkwasser, durch Kontakt mit infizierten Tieren oder auf fäkal-oralem Weg bei Kindern. Die infektiöse Dosis ist mit 500 Bakterien relativ gering. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 5 Tagen kommt es bei Personen, die an Campylobacteriose erkranken zu Fieber, Durchfall, Bauchkrämpfen, Erbrechen, Bauchschmerzen und Übelkeit. Als seltene langfristige Komplikationen können Autoimmunerkrankungen auftreten, zum Beispiel das Guillain-Barré-Syndrom.<sup>4</sup>

*Salmonella*-Spezies sind auch eine der Hauptursachen einer bakteriellen Gastroenteritis weltweit. Derzeit sind mehr als 2.500 *Salmonella*-Serotypen beschrieben, die eine Gattung mit den beiden Arten *S. enterica* und *S. bongori* bilden und humanpathogen sind. Salmonellen verursachen Salmonellose oder Typhus. Jedes Jahr treten weltweit schätzungsweise 93,8 Millionen Fälle von Salmonellose mit 155.000 Todesfällen auf.<sup>6</sup> Das CDC schätzt, dass jedes Jahr in den USA mehr als 1,2 Millionen Fälle von Salmonellose mit mehr als 23.000 Krankenhauseinweisungen und 450 Todesfällen auftreten, sowie mehr als 1.800 Fälle von Typhus.<sup>5</sup> Die meisten der Salmonellose-Infektionen werden durch *S. typhimurium* und *S. enteritidis* verursacht, während Typhus durch *S. typhi* und *S. paratyphi* A, B oder C verursacht wird. Die Übertragung von Salmonellen erfolgt durch kontaminierte Lebensmittel, kontaminiertes Wasser oder durch Kontakt mit infizierten Tieren. Die infektiöse Dosis von Salmonellen variiert von 1 bis 1000 Bakterien. Eine Salmonellose tritt nach einer Inkubationszeit von 6 – 72 h mit klinischen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Bauchkrämpfe, Durchfall, Fieber und Kopfschmerzen auf. Bei Personen, die an Typhus erkranken, kommt es innerhalb 1 bis 3 Wochen nach Kontakt mit dem Organismus zu Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, hohem Fieber (ab 39 °C bis 41 °C) und gastrointestinalen Symptomen, einschließlich Bauchschmerzen und Durchfall.<sup>3,7</sup>

*Yersinia enterocolitica* ist eine von drei *Yersinia* Arten (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) der Gattung *Yersinia*, die für den Menschen pathogen sind und die intestinale Yersiniose verursachen. Das US-amerikanische Lebensmittel-qualitätsprogramm „FoodNet“ berichtet für die USA eine Inzidenz von einem diagnostiziertem Fall pro 100.000 Personen jährlich.

Das Europäische Centre for Disease Prevention and Control berichtete 8.874 Fälle von Yersiniose im Jahr 2007, von denen etwa 5000 Fälle aus Deutschland stammten. Eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica* erfolgt durch kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser. Die geschätzte Infektionsdosis liegt bei  $10^4$  bis  $10^6$  Bakterien. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 11 Tagen kommt es bei Personen, die an einer Yersiniose erkranken zu Durchfall, Erbrechen und Bauchschmerzen. *Y. enterocolitica* kann auch eine reaktive Arthritis verursachen.<sup>3,8</sup>

Die klassische Methode für die Labordiagnose von bakteriellen gastrointestinalen Erregern ist der kulturelle Nachweis, der mehrere Tage erfordert. Die RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR ist eine neue und attraktive Alternativmethode zur Untersuchung von Stuhlproben und hat sich als hoch sensitiv und spezifisch für den gleichzeitigen Nachweis der drei wichtigsten Durchfall verursachenden Bakterien (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Y. enterocolitica*) erwiesen.

### 3. Testprinzip

RIDA®GENE Bacterial Stool Panel ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und *Yersinia enterocolitica* in humanen Stuhlproben. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragemente für *Salmonella* spp. (ttr), *Campylobacter* spp. (16s-rDNA) und *Yersinia enterocolitica* (ail) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen von *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und *Y. enterocolitica* 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 Bacterial Stool Panel 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 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 Bacterial Stool Panel 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)
  - 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](mailto: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](http://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-Extraktionskit (z.B. 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 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt.

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
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

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®, Rotor-Gene Q

Initiale Denaturation	1 min, 95 °C
<u>Zyklen</u>	45 Zyklen
PCR Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Bemerkung:** Annealing und Extension finden im selben Schritt statt.

**Hinweis:** Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 30.0 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.

Tab. 5: Real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, m2000rt und CFX96™

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

**Bemerkung:** Annealing und 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	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
Cepheid SmartCycler®	<i>Salmonella</i> spp.	Kanal 1	Stellen Sie die „Man. Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 bis 4 auf 5.0 ein *
	ICD	Kanal 2	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Kanal 3	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Kanal 4	
ABI 7500	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
Abbott m2000rt	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Salmonella</i> spp.	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Red	
Bio-Rad CFX96™	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	

\*In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor Einheiten“ 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  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  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 * <sup>1</sup>	Siehe QAC
NTC	Negativ	Ct > 20	0

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

Wenn die Positivkontrolle (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 (*Salmonella* spp.) auf dem LightCycler® 480II

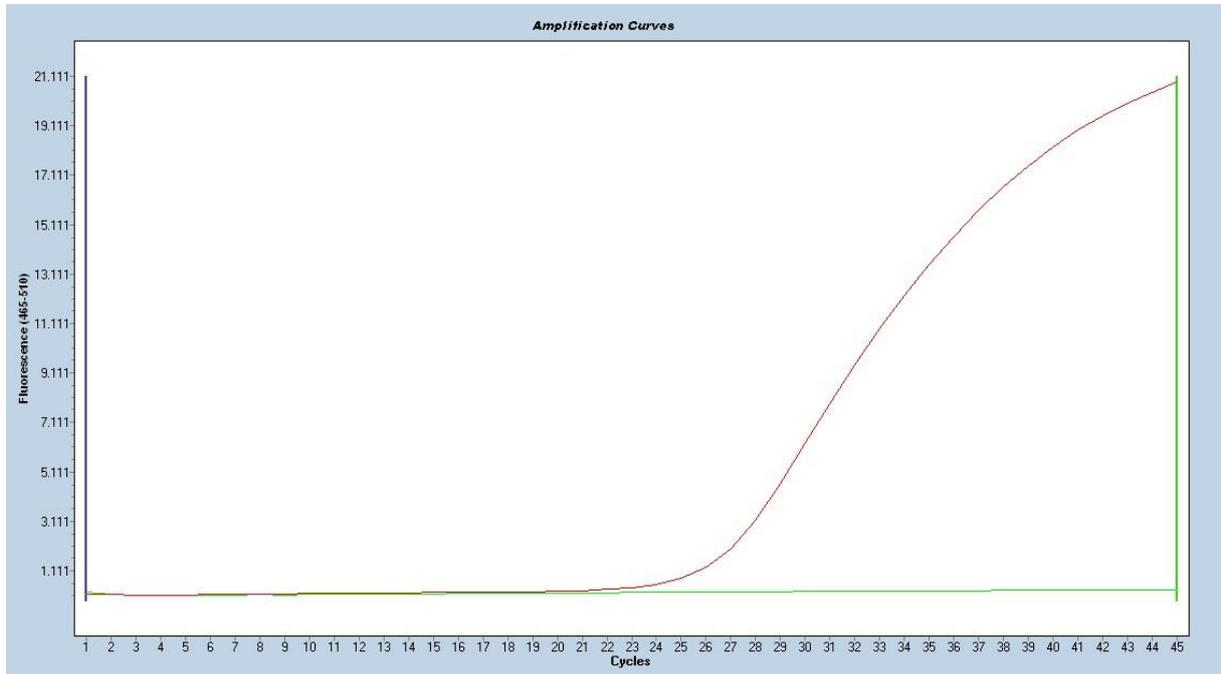


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (*Yersinia enterocolitica*) auf dem LightCycler® 480II

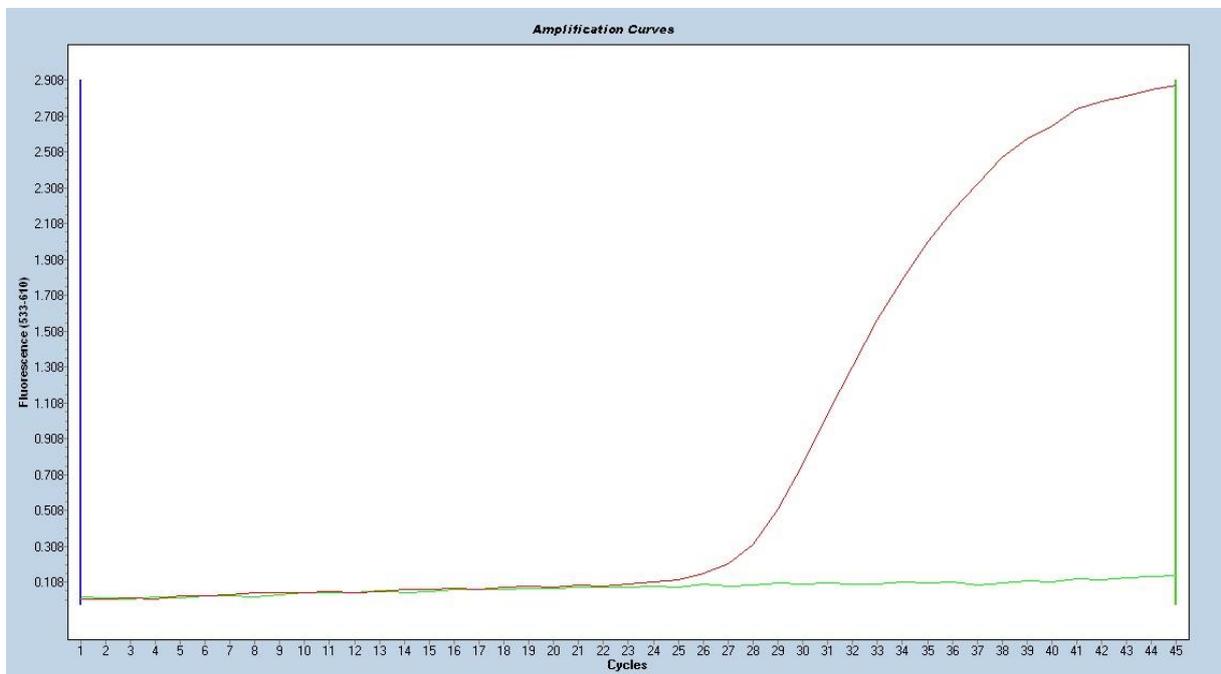
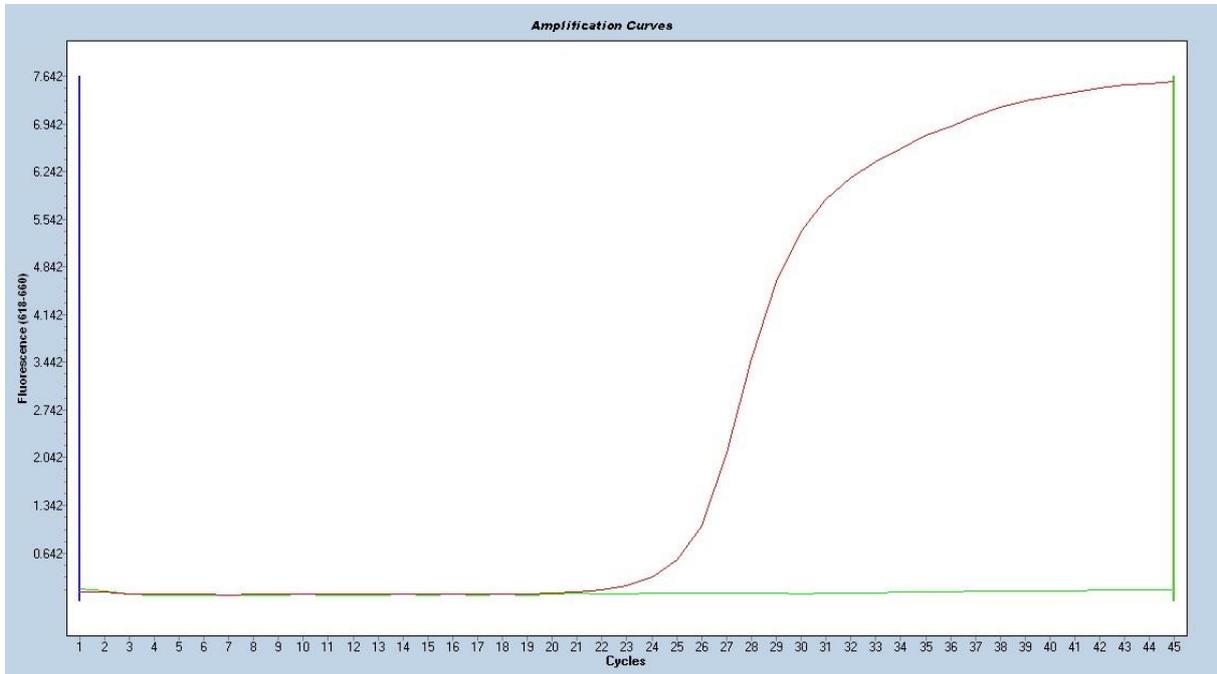


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (*Campylobacter* spp.) auf dem LightCycler® 480II



## 11. Auswertung und Interpretation

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab.8: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene				
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	ICD	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>Salmonella</i> spp.
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>Yersinia enterocolitica</i>
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>Campylobacter</i> spp.
negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ Zielgene sind nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

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 Stuhlproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregion können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Bacterial Stool Panel 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 entsprechenden Zielgene vorhanden sind.

### 13. Leistungsmerkmale

#### 13.1 Klinische Leistungsfähigkeit

In einer prospektiven Studie am Medizinischen Labor Professor Schenk / Dr. Ansorge & Kollegen wurden Stuhlproben von symptomatischen Patienten mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR untersucht und die Ergebnisse mit denen aus der Kultur, gefolgt von einer MALDI-TOF Analyse, verglichen. Die Ergebnisse im Vergleich zur Kultur sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

Tab.9: Korrelation der *Salmonella* spp. Ergebnisse mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR und Kultur

		Kultur		Sensitivität	100,0 %
		positiv	negativ		
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	positiv	44	0	Spezifität	100,0 %
	negativ	0	250	PPW	100,0 %
				NPW	100,0 %

Tab.10: Korrelation der *Y. enterocolitica* Ergebnisse mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR und Kultur

		Kultur		Sensitivität	100,0 %
		positiv	negativ		
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	positiv	11	0	Spezifität	100,0 %
	negativ	0	283	PPW	100,0 %
				NPW	100,0 %

Tab. 11: Korrelation der *Campylobacter* spp. Ergebnisse mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR und Kultur

		Kultur		Sensitivität	100,0 %
		positiv	negativ		
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	positiv	51	3	Spezifität	98,4 %
	negativ	0	240	PPW	94,4 %
				NPW	100,0 %

## 13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 10$  DNA-Kopien/Reaktion für *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* und *Campylobacter* spp. (s. Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6). Für die Nutzung auf dem SmartCycler<sup>®</sup> gilt eine Nachweisgrenze von  $\geq 50$  DNA-Kopien/Reaktion.

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

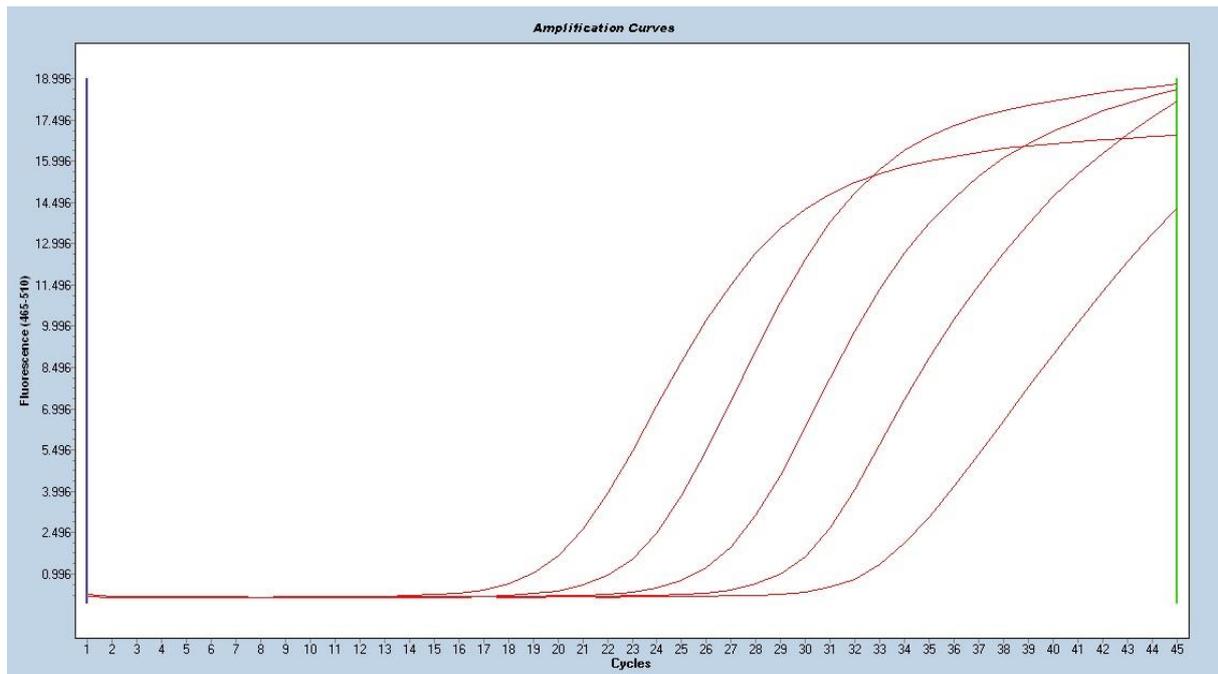


Abb. 5: Verdünnungsreihe *Yersinia enterocolitica* ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) dem LightCycler® 480II

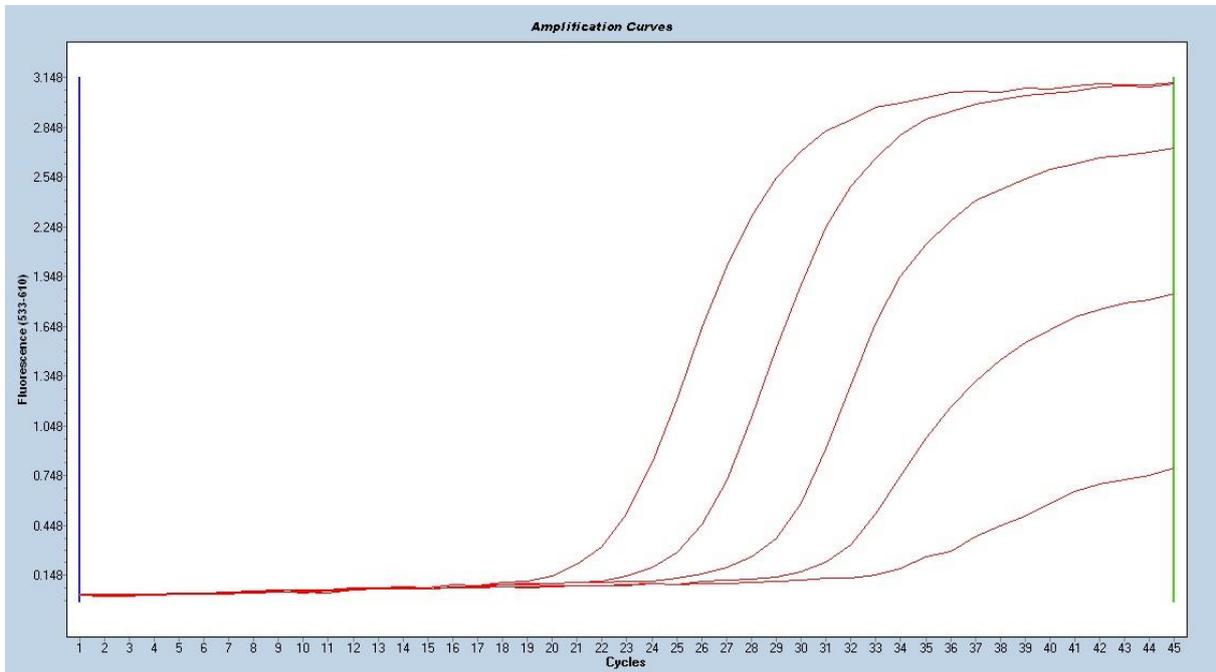
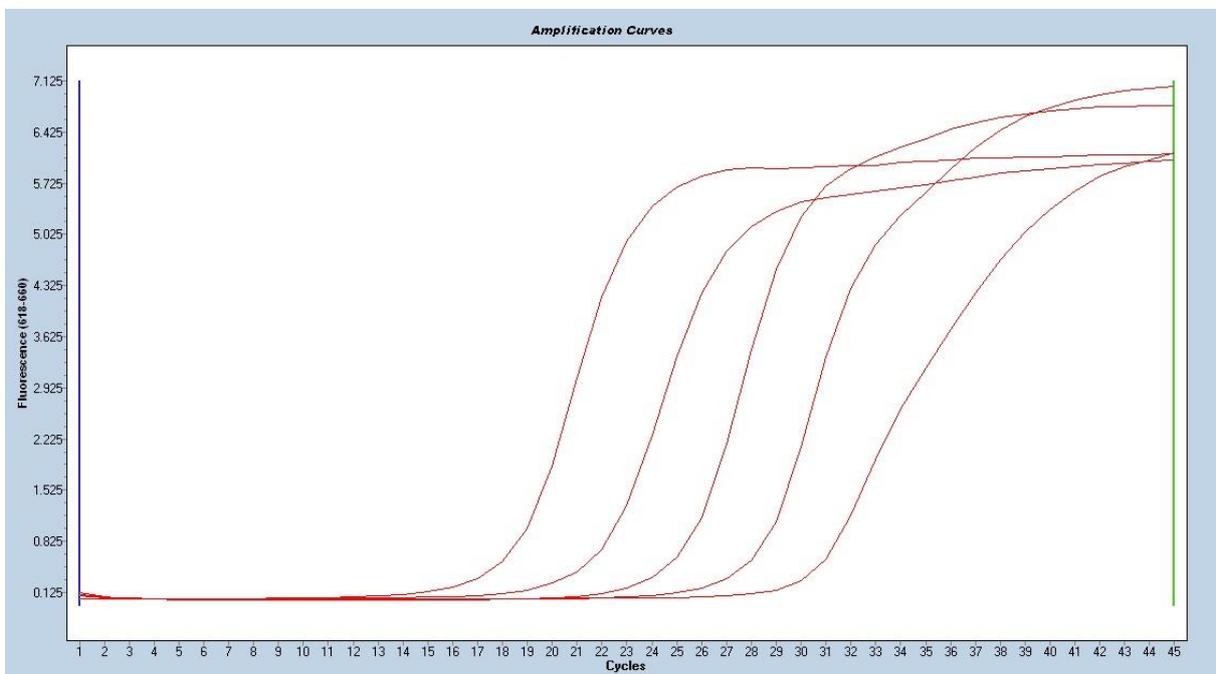


Abb. 6: Verdünnungsreihe *Campylobacter* spp. ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien /  $\mu$ l) dem LightCycler® 480II



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

### 13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* und *Campylobacter* spp. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

Tab.12: Kreuzreaktivitätstestung

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

### 13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen *Campylobacter*-Spezies, *Salmonella*-Serotypen und *Yersinia enterocolitica* untersucht (s. Tab. 13). Alle *Campylobacter*-Spezies, *Salmonella*-Serotypen und *Yersinia enterocolitica* des Probenpanels wurden mit der RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR nachgewiesen.

Tab.13: Analytische Reaktivitätstestung

<b>Campylobacter-Spezies</b>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+	<i>C. fetus</i>	+
<i>C. lari</i>	+	<i>C. upsaliensis</i>	+		
<b>Salmonella-Serotypen</b>					
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+
<i>S. brandenburg</i>	+	<i>S. agona</i>	+	<i>S. infantis</i>	+
<i>S. kiel</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+	<i>S. gloucester</i>	+
<i>S. haifa</i>	+	<i>S. wilhelmsburg</i>	+	<i>S. essen</i>	+
<i>S. virchow</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. blegdam</i>	+
<i>S. rostock</i>	+	<i>S. moscow</i>	+	<i>S. pullorum</i>	+
<i>S. wernigerode</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. duesseldorf</i>	+
<i>S. glostrup</i>	+	<i>S. poona</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. senftenberg</i>	+	<i>S. bongori</i>	+	<i>S. bovismorbificans</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. anatum</i>	+	<i>S. newport</i>	+
<i>S. goldcoast</i>	+	<i>S. dublin</i>	+	<i>S. livingston</i>	+
<i>S. muenchen</i>	+	<i>S. kentucky</i>	+	<i>S. amsterdam</i>	+
<i>S. berta</i>	+	<i>S. caracas</i>	+	<i>S. ealing</i>	+
<i>S. augustenbourg</i>	+	<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. nottingham</i>	+	<i>S. ohio</i>	+		
<b>Yersinia-Spezies</b>					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y. subspecies palearctica</i>			

## Literatur

1. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrheain adults and children : a global perspective.
2. UNICEF/WHO, Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA 2012. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook.
4. Ruiz-Palacios GM. Clinical Infectious Diseases 2007; 44:701–703.
5. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
6. Majowicz SE et al. Clinical Infectious Diseases 2010; 50:882–889.
7. Pui CF et al. International Food Research Journal 2011; 18: 465-473.
8. Rosner BM et al. BMC Public Health 2010; 10:337.