



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 EAEC

REF PG2215



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE EAEC ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) in humanen Stuhlproben.^{1,2} Die RIDA®GENE EAEC multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch enteroaggregative *E. coli* verursachten 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. Toxingene) 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

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) wurden erstmals 1987 im Stuhl eines Kindes aus Chile beschrieben.⁴ Charakteristisches Merkmal der EAEC ist die aggregative Adhärenz (AA). Im Goldstandard HEp-2 Zelladhärenz-Assay adhären EAEC an die Epithelzellen in einem sogenannten "stacked-brick" Muster (gestapelte Backsteine). Definiert werden EAEC als *E. coli*, die keine hitzelablen (LT) oder hitzestabilen (ST) Enterotoxine sezernieren und sich an HEp-2 Zellen in einem AA-Muster adhären.⁵ Die meisten EAEC-Stämme beherbergen ein Virulenzplasmid (pAA), auf dem eine Vielzahl von Virulenzgenen (z.B. *aggR*, *aggA*, *aafA*, *agg3* und *aatA*) lokalisiert sind, die mit der AA in Verbindung gebracht werden.^{6,7,8} Das *aatA* Gen (Anti-Aggregationsprotein-Transportergen, früher EAEC-Sonde bzw. CVD 432 genannt) sowie das *aggR* Gen (Hauptregulator der EAEC-Plasmid-Virulenzgene) werden zum EAEC-Nachweis mittels PCR verwendet.^{8,9,10,11} EAEC-Stämme, die das pAA exprimieren, werden als typische EAEC, solche die es nicht exprimieren, als atypische EAEC bezeichnet.¹² Die häufigste klinische Manifestation einer EAEC-Infektion ist wässriger Durchfall. Weniger häufige klinische Symptome sind leichtes Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und das Vorhandensein von Blut im Stuhl, Schleim oder Leukozyten. Die Inkubationszeit reicht von 8 bis 18 h. In einer Studie mit gesunden Probanden verursachte die orale Gabe von 10¹⁰ EAEC KBE Durchfall. Durch die hohe erforderliche Infektionsdosis wird eine fäkal-orale Übertragung von EAEC durch Lebensmittel oder Wasser vermutet. EAEC sind die Ursache von akuten und chronischen (> 14 Tage) Durchfällen bei Kindern, Erwachsenen und HIV-infizierten Personen, sowohl in Entwicklungs- als auch in Industrieländern.⁸ Es sind nach ETEC die zweithäufigsten Erreger einer Reisediarrhoe bei Reisenden in Entwicklungsländern wie Mexiko, Indien und Jamaika.¹³ EAEC Ausbrüche werden meist mit dem Verzehr von kontaminierten

Lebensmitteln in Verbindung gebracht.¹⁴ EAEC sind bei 2 % - 68 % der Patienten mit Durchfall und bei 0 % - 15 % der Kontrollen aus Indien, Südamerika, Europa und dem Nahen Osten isoliert worden.¹³ In einer Meta-Analyse von veröffentlichten Studien wurde gezeigt, dass EAEC für 15 % aller akuten Diarrhoen bei Kindern in Entwicklungsländern und für 4 % in Industrieländern verantwortlich ist.¹⁵ In Deutschland wurden EAEC in 2 % der pädiatrischen Patienten mit Durchfall isoliert. In der gesunden Kontrollgruppe konnten keine EAEC nachgewiesen werden.¹² Bei Schweizer Kindern wurde EAEC in 10,2 % der Kinder mit Durchfall, verglichen mit 2,2 % der Kinder ohne Durchfall isoliert. In den USA wurde EAEC in 4,5 % der Patienten mit Diarrhoe und in 1,7 % der asymptomatischen Patienten nachgewiesen.¹⁶

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE EAEC ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis enteroaggregativer *E. coli* (EAEC). Nach der DNA-Isolierung wird (falls vorhanden) die für EAEC spezifischen Genfragmente (aat, aggR) 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 EAEC 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 | <u>Reaction Mix</u> | 2x | 1050 µl | gelb |
| 2 | <u>Taq-Polymerase</u> | 1x | 80 µl | rot |
| D | <u>Internal Control DNA</u> | 2x | 1700 µl | orange |
| N | <u>No Template Control</u> | 1x | 450 µl | weiß |
| P | <u>Positive Control</u> | 1x | 200 µl | blau |

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -16 °C bis -28 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 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 EAEC 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 |
| bioMérieux | NucliSENS® easyMAG® |
| Real-time PCR-Geräte | |
| Roche | LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II |
| 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
- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei)

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)) für Stuhlproben 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 1.000 x g zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA®GENE EAEC 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.

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® 2.0 | EAEC | 530 | RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt |
| | ICD | 560 | |
| Roche LightCycler® 480II | EAEC | 465/510 | RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt |
| | ICD | 533/580 | |
| Agilent Techn. Mx3005P | EAEC | FAM | Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none |
| | ICD | HEX | |
| ABI 7500 | EAEC | FAM | Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none |
| | ICD | VIC | |
| Bio-Rad CFX96™ | EAEC | FAM | - |
| | ICD | VIC | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | EAEC | Green | Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein |
| | ICD | Yellow | |

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).

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

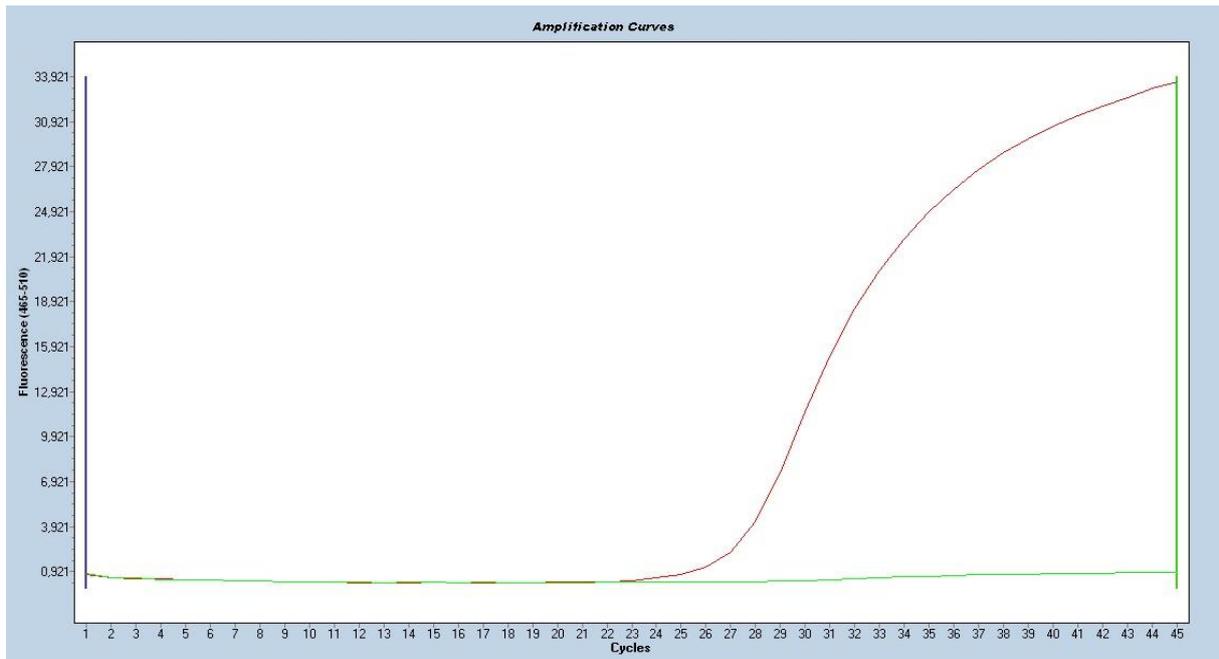


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (EAEC) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Interpretation der Ergebnisse

| Pathogenitätsfaktor-Gene | | |
|--------------------------|-----------------|----------------------------|
| aat/aggR | ICD | Ergebnis |
| positiv | positiv/negativ | EAEC nachweisbar |
| negativ | positiv | Zielgene nicht nachweisbar |
| negativ | negativ | Ungültig |

EAEC ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

EAEC ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control DNA** jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. 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.

EAEC ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control DNA** jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control DNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** keine Amplifikation im Nachweissystem 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 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 Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE EAEC 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 (aat, aggR) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE EAEC multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien / Reaktion.

Die folgende Abbildung 2 zeigt eine Verdünnungsreihe von EAEC (10^5 - 10^1 DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II.

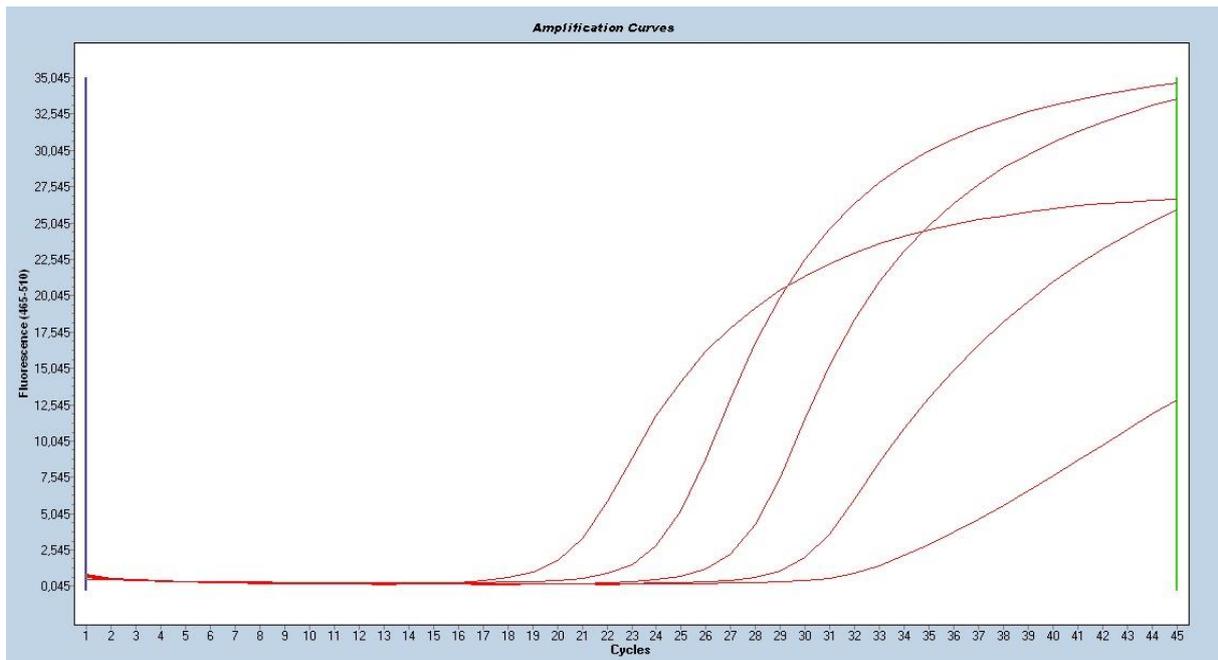


Abb. 2: Verdünnungsreihe EAEC (10^5 - 10^1 DNA Kopien / μ l) auf dem LightCycler® 480II

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

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE EAEC multiplex real-time PCR ist spezifisch für enteroaggregative *E. coli*. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab.12):

Tab. 12: Kreuzreaktivitätstestung

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

14. Versionsübersicht

| Versionsnummer | Kapitel und Bezeichnung |
|----------------|--|
| 2013-01-30 | Freigabeversion |
| 2018-09-03 | Generelle Überarbeitung |
| 2018-09-03 | 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 11. Interpretation der Ergebnisse 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung |
| 2023-04-17 | 5. Reagenzien und ihre Lagerung |

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

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

Testspezifische Symbole

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. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73 (10): 3380-3390.
2. Cordeira F *et al.* Evaluation of a Multiplex PCR for Identification of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2008, 46 (2): 828-829.
3. Kaper JM *et al.* PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *Nature Reviews Microbiology* 2004, 2:123-140.
4. Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005, 21: 4-8.
5. Nataro JP and Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998, 11(1): 142-201.
6. Law D and Chart H. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 1998, 84: 685-697.
7. Vial PA *et al.* Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 1988, 158: 70-79.
8. Huang DB *et al.* A review of an emerging enteric pathogen: Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 2006, 55: 1303-1311.
9. Baudry B *et al.* A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J Infect Dis* 1990, 161: 1249-1251.
10. Schmidt H *et al.* Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 701-705.
11. Nishi J *et al.* The Export of Coat Protein from Enteroaggregative *Escherichia coli* by a Specific ATP-binding Cassette Transporter System. *J Biol Chem* 2003, 278 (46): 45680-45689.
12. Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol* 2007, 56: 4-8.
13. Adachi JA *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin Infect Dis* 2001, 32: 1706-1709.
14. Nataro JP *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 1998, 4(2): 251-261.
15. Huang DB *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006, 43: 556-563.
16. Cennimo DJ *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli*: A Review of Trends, Diagnosis, and Treatment. *Infect Med* 2007, 24: 100- 110.