

RIDA® GENE EHEC/EPEC

REF PG2205



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA® GENE EHEC/EPEC es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de los genes que codifican los factores de virulencia de ECEH, ECTS, ECEP, ECEI/*Shigella* spp. en muestras y cultivos de heces humanas.^{1,2}

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA® GENE EHEC/EPEC está concebido como una ayuda para el diagnóstico de la gastroenteritis causada por cepas patógenas de *Escherichia coli* y *Shigella* spp., respectivamente.

2. Resumen y descripción del ensayo

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo, que se mueve mediante flagelos peritricos y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. *E. coli* forma parte de la microbiota intestinal normal de los humanos y de varios animales de granja, y por lo general no es patógena. Algunas cepas de *E. coli* son patógenas para los seres humanos a través de la adquisición de ciertos factores de virulencia (p. ej., genes de toxinas).

Las seis cepas intestinales patógenas conocidas de *E. coli*: *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotóxica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregante (ECEA) y *E. coli* adherente difusa (ECAD) se pueden diferenciar por los factores de virulencia.³

E. coli enterohemorrágica (ECEH) es en la actualidad la cepa intestinal patógena más importante de *E. coli*. Cada año, se notifican en Alemania más de 1000 casos de enfermedad causada por una infección con *E. coli* enterohemorrágica (ECEH). ECEH es un subgrupo de *E. coli* productoras de toxina Shiga o verotoxina (ECTS o ECVT) y tiene la capacidad para producir dos citotoxinas, las verotoxinas 1 y 2. Debido a la similitud entre las verotoxinas y la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae*, a ECVT también se denomina ECTS. Otro factor de virulencia diagnóstico importante de ECEH es el gen *eae* (gen de adherencia y borrado de *E. coli*) que codifica la intimina. ECEH/ECTS se puede distinguir de *Shigella*/ECEI mediante la detección del gen *ipaH* (gen del antígeno del plásmido de invasión H).

Los síntomas clínicos causados por ECEH van desde diarreas leves, pasando por gastroenteritis graves, hasta colitis hemorrágicas, que se producen en aproximadamente el 10 % al 20 % de los casos de infección. En el 5 - 10 % de las infecciones, en particular en bebés y niños pequeños, así como en ancianos o pacientes inmunodeprimidos, también puede dar lugar a síndrome hemolítico urémico (SHU) o púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) como complicación potencialmente mortal de la infección. Con el SHU y la PTT, la mortalidad es especialmente elevada entre los lactantes (aprox. 10 - 15 %). Se puede producir insuficiencia renal aguda que requiera temporalmente diálisis, o una pérdida irreversible de la función renal que derive en una necesidad constante de diálisis. La intensidad del cuadro clínico depende de la predisposición del paciente, pero también del fenotipo correspondiente de ECEH; esto significa que el progreso de la

enfermedad también depende de las diferentes formas en que se expresan los factores de virulencia. También participan factores aún desconocidos en este momento. El periodo de incubación es de aproximadamente 2 a 10 días. Debido a la elevada resistencia medioambiental, la dosis infecciosa de ECEH es de tan solo aproximadamente 100 microorganismos. Las fuentes de infección son los alimentos contaminados procedentes del ganado ovino o caprino, en particular la carne cruda o los productos cárnicos que no se hayan cocido lo suficiente, la leche cruda no pasteurizada o certificada, y las frutas y verduras contaminadas. Las cadenas infecciosas de persona a persona, en especial en centros comunitarios como guarderías, hogares de ancianos u hospitales, así como el contacto directo con animales también son importantes.^{4,5}

E. coli enteropatógena (ECEP) causa diarrea, especialmente en niños menores de 2 años. El factor de virulencia de ECEP es también el gen *eae*.⁴

3. Principio del ensayo

RIDA[®]GENE EHEC/EPEC es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de los genes que codifican los factores de virulencia de ECEH, ECTS, ECEP y ECEI/*Shigella* spp.

Después del aislamiento del ADN, tiene lugar la amplificación de los fragmentos de genes específicos para los factores de virulencia *stx1/stx2*, *eae* e *ipaH* (si están presentes). Las dianas amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA[®]GENE EHEC/EPEC contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra y para determinar la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 reacciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (entre 2 °C y 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA® GENE EHEC/EPEC es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2 Equipamiento necesario

Plataformas de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS® easyMAG®
Roche	MagNA Pure
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II y el LightCycler® 480 z
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua de grado BioScience, sin nucleasas).

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ADN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de aislamiento de ADN (como RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:3 con agua antes de la extracción. Agite intensamente en un mezclador vórtex la muestra de heces diluida y centrifúguela a 1000 x g durante 30 segundos. Use el volumen adecuado de sobrenadante según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA[®] GENE EHEC/EPEC contiene un Internal Control DNA que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El Internal Control DNA puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el Internal Control DNA se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de Internal Control DNA a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

8.2 Preparación de la muestra a partir de cultivos

Para el aislamiento del ADN a partir de muestras de cultivo, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar el ADN a partir de un cultivo se recomienda el procedimiento siguiente: Agregue 1 ml de agua para PCR a un tubo de preparación. Coseche las colonias con un asa de inoculación y suspéndalas en el agua para PCR preparada. Corte o rompa el vástago del asa de inoculación. Tape bien el tubo de preparación y agítelo en un mezclador vórtex a alta velocidad durante 60 segundos. Caliente y agite el tubo de preparación a 95 °C durante 10 min en un bloque calefactor. Centrifugue durante 1 min a 13 000 x g y aplique el sobrenadante como muestra.

Nota: Si la muestra está muy turbia, repita el paso de centrifugación (si es necesario).

El ensayo RIDA[®] GENE EHEC/EPEC contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de muestra-agua para PCR y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo deben incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control DNA** antes de utilizarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Añada 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

Muestra: Añada 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7 y 8).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de ADN por PCR en tiempo real para los equipos serie LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil de PCR en tiempo real del ADN para Mx3005P, ABI 7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 480II	stx1/stx2	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICD	533/580	
	ipaH	533/610	
	eae	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	stx1/stx2	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICD	540/580	
	ipaH	540/610	
	eae	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	stx1/stx2	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
ABI 7500	stx1/stx2	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	stx1/stx2	FAM	-
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Qiagen Rotor-GENE Q	stx1/stx2	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICD	Amarillo	
	ipaH	Naranja	
	eae	Rojo	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real utilizado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figuras 1, 2 y 3) para determinar una corrida válida.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 10: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND * ¹	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

*¹ No se requiere un valor de Ct del ICR para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

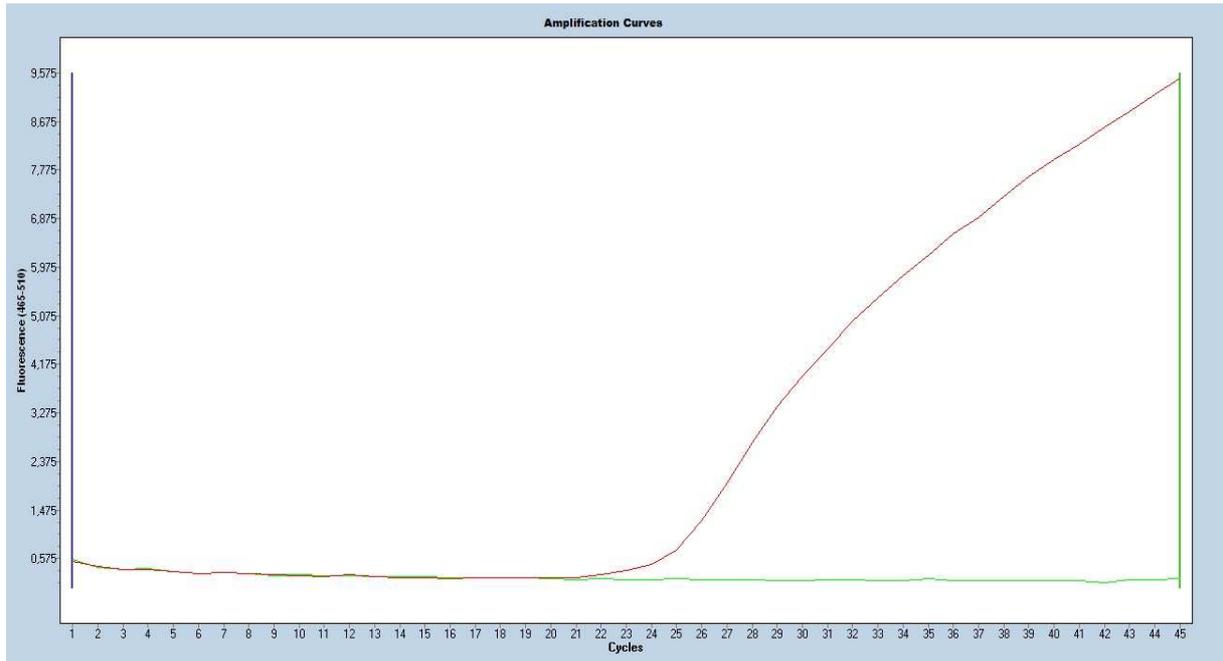


Fig. 1: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (stx1/stx2) en el LightCycler® 480II

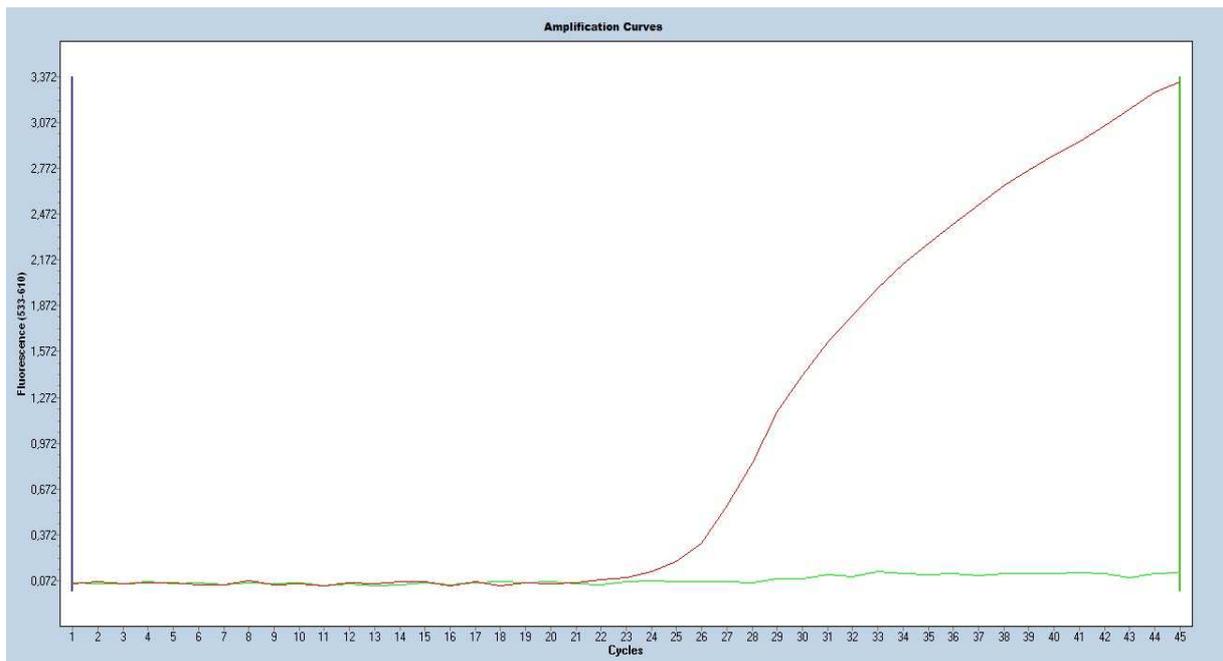


Fig. 2: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (ipaH) en el LightCycler® 480II

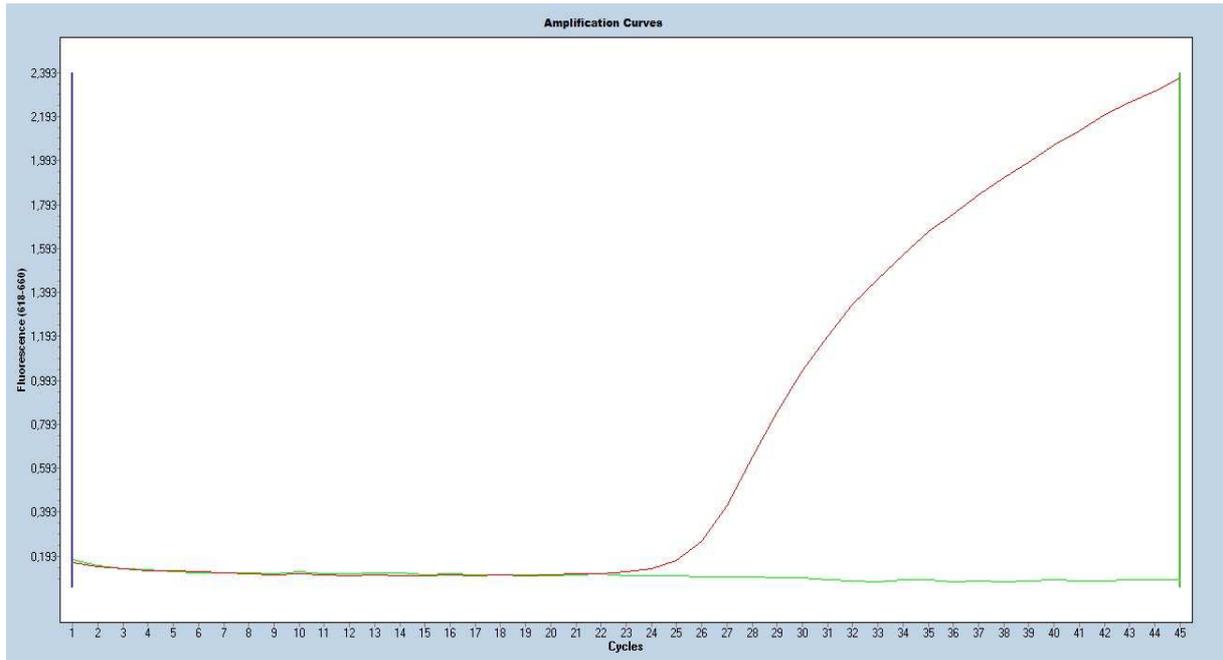


Fig. 3: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (eae) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

Tabla 11: Interpretación de las muestras

Genes del factor de virulencia				
stx1/stx2	ipaH	eae	ICD	Resultado
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	ECTS (ECEH) detectada
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	ECEI/ <i>Shigella</i> spp. detectada
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	ECEP detectada
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	ECST (ECEH) y ECEI/ <i>Shigella</i> spp. detectadas
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	ECEH detectada
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	ECEI/ <i>Shigella</i> spp. y ECEP detectadas
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	ECEH y ECEI/ <i>Shigella</i> spp. detectadas
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

Según la legislación alemana para el control de infecciones (IfSG) se denomina ECEH a las ECTS (*E. coli* productoras de toxina Shiga) que son patógenas para los seres humanos. Debido a que no existe una definición específica de ECTS patógenas para los seres humanos, cada ECTS debe considerarse como posible ECEH.⁵

Se determina que una muestra es negativa si no presenta señal de amplificación en el sistema de detección, pero el **Internal Control DNA** es positivo. La inhibición de la reacción de PCR o un fallo en el procedimiento de extracción se pueden excluir por la detección del **Internal Control DNA**.

Se determina que una muestra es positiva si, tanto la muestra como el **Internal Control DNA**, presentan señal de amplificación en el sistema de detección.

Se determina que una muestra es positiva si presenta señal de amplificación en el sistema de detección, pero el **Internal Control DNA** es negativo. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas

concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del control de amplificación interno sea débil o esté ausente.

Se determina que una muestra no es válida si ni la muestra ni el **Internal Control DNA** presentan una señal de amplificación en el sistema de detección. La muestra contenía un inhibidor de la PCR o se produjo un fallo en el procedimiento de extracción. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces y cultivos.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®] GENE EHEC/EPEC.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia de los genes diana (stx1/stx2, ipaH, eae).
8. **La mucina, incluso en pequeñas cantidades, puede producir interferencias.**

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE EHEC/EPEC tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción para stx1/stx2, ipaH y eae, respectivamente.

Las siguientes figuras 4, 5 y 6 muestran diluciones seriadas de los genes stx1/stx2, ipaH y eae (10^5 a 10^1 copias de ADN por μl en cada caso) en el LightCycler® 480II.

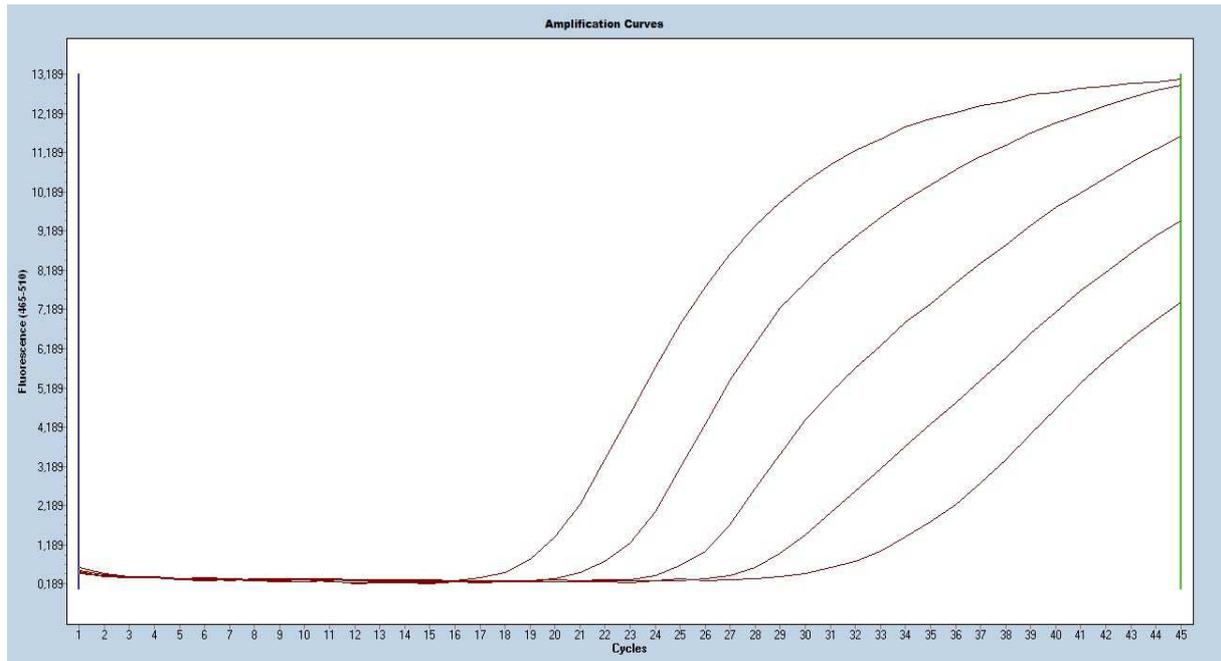


Fig. 4: Dilución seriada de los genes de la toxina Shiga stx1/stx2 (10^5 a 10^1 copias de ADN/ μl) en el LightCycler® 480II

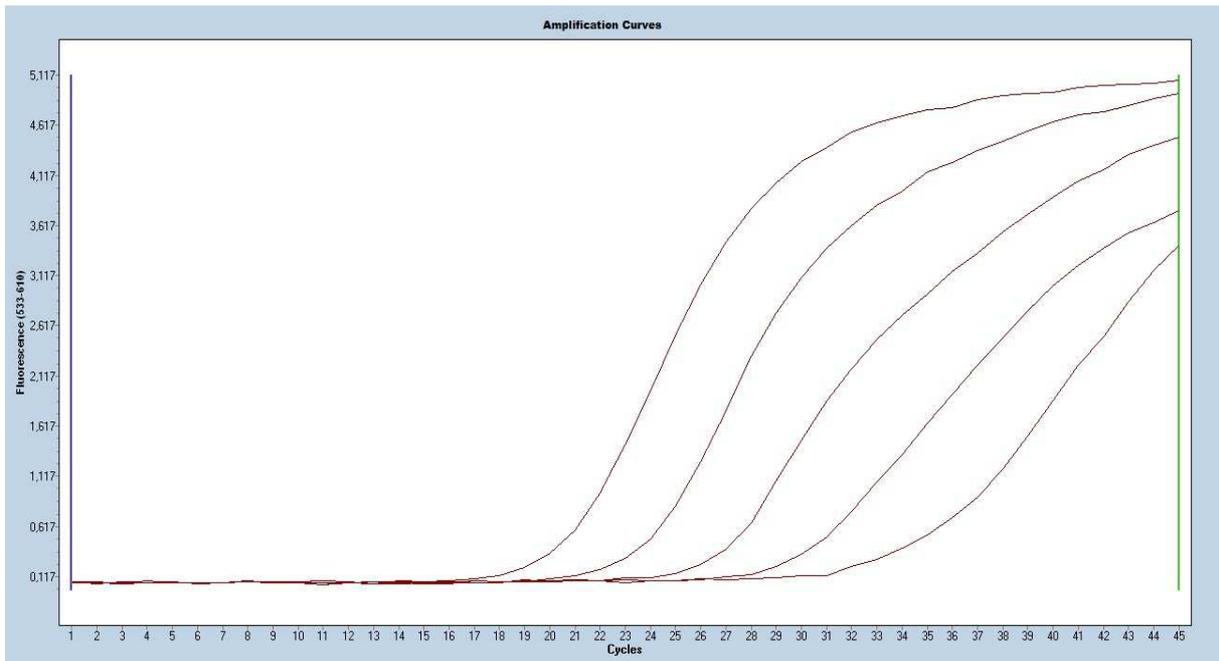


Fig. 5: Dilución seriada del gen ipaH (10^5 a 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler[®] 480II

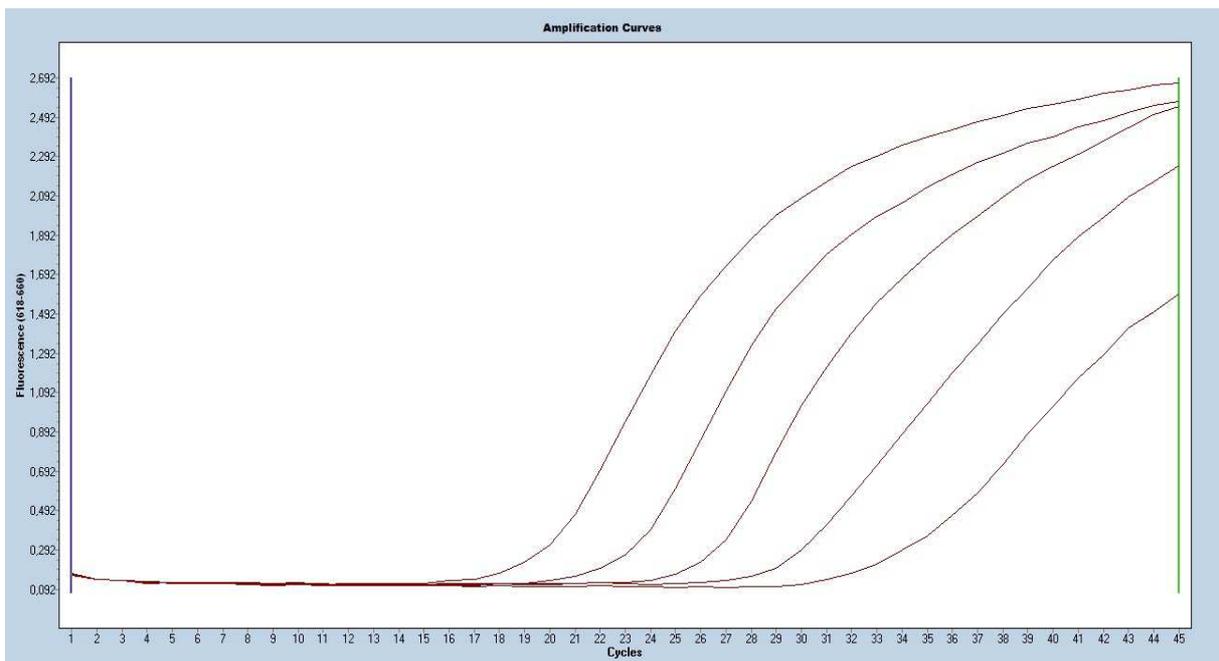


Fig. 6: Dilución seriada del gen eae (10^5 a 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler[®] 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

13.2 Especificidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE EHEC/EPEC es específico para stx1/stx2, ipaH y eae. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12).

Tabla 12: Ensayos de reactividad cruzada

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

13.3 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE EHEC/EPEC se evaluó contra varios subtipos de los genes stx1 y stx2, y de los genes ipaH y eae (consulte la tabla 13). El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE EHEC/EPEC detectó los siguientes subtipos de stx1 y stx2:

Tab.13: Pruebas de reactividad analítica

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

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2014-08-14	Versión de lanzamiento
2018-08-24	Revisión general
2018-08-24	4. Reactivos suministrados 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 8. Obtención y almacenamiento de muestras 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 11. Interpretación de los resultados 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

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.