

RIDA® GENE EHEC/EPEC

REF PG2205



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA[®]GENE EHEC/EPEC è un test di PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e la differenziazione dei geni del fattore di virulenza di EHEC, STEC, EPEC, EIEC/*Shigella* spp. in campioni e colture di feci umane.^{1,2}

RIDA[®]GENE EHEC/EPEC PCR real-time è adatto come ausilio nella diagnosi di gastroenterite causata rispettivamente da *Escherichia coli* patogeni e *Shigella* spp.

2. Sintesi e spiegazione del test

Gli *Escherichia coli* (*E. coli*) sono batteri a bastoncello, anaerobi facoltativi, Gram-negativi, che si muovono mediante flagelli peritrichi e appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae.

Gli *E. coli* fanno parte della normale flora intestinale degli esseri umani e di molti animali da allevamento e sono generalmente non patogeni. Alcuni ceppi di *E. coli* sono patogeni per l'uomo attraverso l'acquisizione di alcuni fattori di virulenza (ad esempio geni codificanti per le tossine).

I sei patogeni intestinali conosciuti di *E. coli*: *E. coli* enteroemorragico (EHEC), *E. coli* enteropatogeno (EPEC), *E. coli* enterotossigeno (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroaggregante (EAEC) e *E. coli* diffusamente aderente (DAEC) possono essere differenziati in base ai fattori di virulenza.³

Gli *E. coli* enteroemorragici (EHEC) sono attualmente gli *E. coli* patogeni intestinali più importanti. Ogni anno in Germania sono segnalati circa 1000 casi di malattia dovuti a un'infezione da *E. coli* enteroemorragico (EHEC).

Gli EHEC sono un sottogruppo di *E. coli* produttore della tossina Shiga o della Verotoxin (STEC o VTEC) e sono in grado di produrre due citotossine, Verotoxin 1 e 2. Data la stretta somiglianza tra le Verotoxin e le tossine Shiga di *Shigella dysenteriae*, le VTEC sono anche chiamate STEC. Un altro importante fattore di virulenza diagnostico per EHEC è il gene *eae* (il gene di adesione e scomparsa di *E. coli*) che codifica per l'intimina. L'individuazione del gene *ipaH* (antigene plasmidico di invasione H) consente di distinguere EHEC/STEC da *Shigella*/EIEC.

I sintomi clinici causati da EHEC variano da forme lievi di diarrea a gastroenteriti gravi fino alla colite emorragica, che insorge in circa il 10 - 20 % delle infezioni. Con il 5 - 10 % delle infezioni, in particolare nei neonati e bambini piccoli, così come in pazienti anziani o pazienti con sistema immunitario indebolito, questo può anche causare sindrome uremica emolitica (HUS) o porpora trombocitopenica trombotica (TTP), una complicanza post-infettiva che mette a rischio la vita. Nel caso di HUS e TTP, la mortalità è particolarmente elevata tra i neonati (circa 10 - 15 %). Può verificarsi insufficienza renale acuta con un bisogno temporaneo di dialisi o una perdita irreversibile della funzione renale e conseguente necessità costante di dialisi. L'intensità del quadro clinico dipende dalla predisposizione del paziente, ma anche dal corrispondente fenotipo EHEC; questo significa che il progresso della malattia dipende anche dai diversi modi in cui sono espressi i fattori di virulenza. Inoltre, sono

coinvolti alcuni fattori ancora oggi sconosciuti. Il periodo di incubazione è di circa 2 - 10 giorni. A causa della elevata resistenza ambientale, la dose infettante per EHEC è solo di circa 100 organismi. Le fonti di infezione sono alimenti contaminati da bovini, ovini o caprini, particolarmente carne cruda o prodotti della carne che non sono stati riscaldati a sufficienza, latte crudo non pastorizzato o certificato e frutta e verdura contaminata. L'infezione passa da una persona all'altra, soprattutto nelle strutture comunitarie come asili, case di riposo od ospedali, senza contare l'importanza dei contatti diretti con gli animali.^{4,5}

E. coli enteropatogeno (EPEC) causa diarrea in particolare nei bambini al di sotto dei 2 anni. Il fattore di virulenza di EPEC è anche il gene *eae*.⁴

3. Principio del test

RIDA[®]GENE EHEC/EPEC è un test di PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e la differenziazione dei geni del fattore di virulenza di EHEC, STEC, EPEC ed EIEC/*Shigella* spp.

Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione dei frammenti genetici specifici per i fattori di virulenza *stx1/stx2* e *ipaH* (se presenti). I target amplificati vengono rivelati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA[®]GENE EHEC/EPEC contiene un **Internal Control DNA** (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione del campione e per determinare la possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 reazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampigliata. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongela accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongelo senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati in ambiente freddo, in modo appropriato (2 - 8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test di PCR real-time RIDA[®] GENE EHEC/EPEC è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real-time elencati di seguito:

Tabella 2 Attrezzatura necessaria

Piattaforme di estrazione	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS [®] easyMAG [®]
Roche	MagNA Pure
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Avvertenze: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler[®] 480II e LightCycler[®] 480 z
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- **Acqua per PCR (acqua di grado bioscientifico, priva di nucleasi).**

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in locali separati per evitare contaminazione crociata.

- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.

- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento del DNA da campioni di feci umane utilizzare un kit (ad es. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni di feci con acqua in rapporto 1:3. Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 x g per 30 sec. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA[®] GENE EHEC/EPEC contiene un Internal Control DNA che rileva l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'Internal Control DNA può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'Internal Control DNA viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di Internal Control DNA alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l'Internal Control DNA viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di Internal Control DNA durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

8.2 Preparazione del campione da colture

Per l'isolamento del DNA da campioni colturali umane utilizzare un kit (ad es. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibili in commercio (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore. Per l'isolamento del DNA dalla coltura si raccomanda la seguente procedura: Dispensare 1 µl di acqua per PCR in una provetta di preparazione. Raccogliere le colonie con un'ansa da inoculo e sospenderle nell'acqua per PCR preparata. Tagliare o rompere il gambo dell'ansa da inoculo. Chiudere la provetta di preparazione ermeticamente e agitare vigorosamente per 60 secondi. Scaldare e agitare la provetta di preparazione a 95 °C per 10 minuti in un modulo riscaldante. Centrifugare per 1 minuto a 13,000 x g e applicare il surnatante come campione.

Avvertenze: ripetere la fase di centrifugazione in caso di forte torbidità (se necessario).

Il test RIDA[®] GENE EHEC/EPEC contiene un **Internal Control DNA** che rileva l'inibizione della PCR, controlla l'integrità dei reagenti e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela campione-acqua per PCR e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10% a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tabella 3, Tabella 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], il [Positive Control], il [No Template Control] e l'[Internal Control DNA]. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2 – 8 °C).

Tabella 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

Tabella 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
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
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

Campione: dispensare 5 µl di estratto di DNA nella Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (Tabella 5, Tabella 6, Tabella 7, Tabella 8).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo della PCR real-time per DNA

Tabella 5: Profilo della PCR real-time del DNA per le serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 6: Profilo PCR real-time DNA per Mx3005P, ABI 7500 e CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.3.2 Profilo della PCR real-time universale

Avvertenze: il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA® GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

Tabella 7: Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler®

Trascrizione inversa	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 8: Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

Trascrizione inversa	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	stx1/stx2	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
	ipaH	533/610	
	eae	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	stx1/stx2	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
	ipaH	540/610	
	eae	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	stx1/stx2	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICD	HEX	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
ABI 7500	stx1/stx2	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	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	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICD	Giallo	
	ipaH	Arancione	
	eae	Rosso	

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, occorre che il controllo positivo e il controllo negativo mostrino risultati corretti (vedere Tabella 10, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tabella 10: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA ^{*1}	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

^{*1} Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICR.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

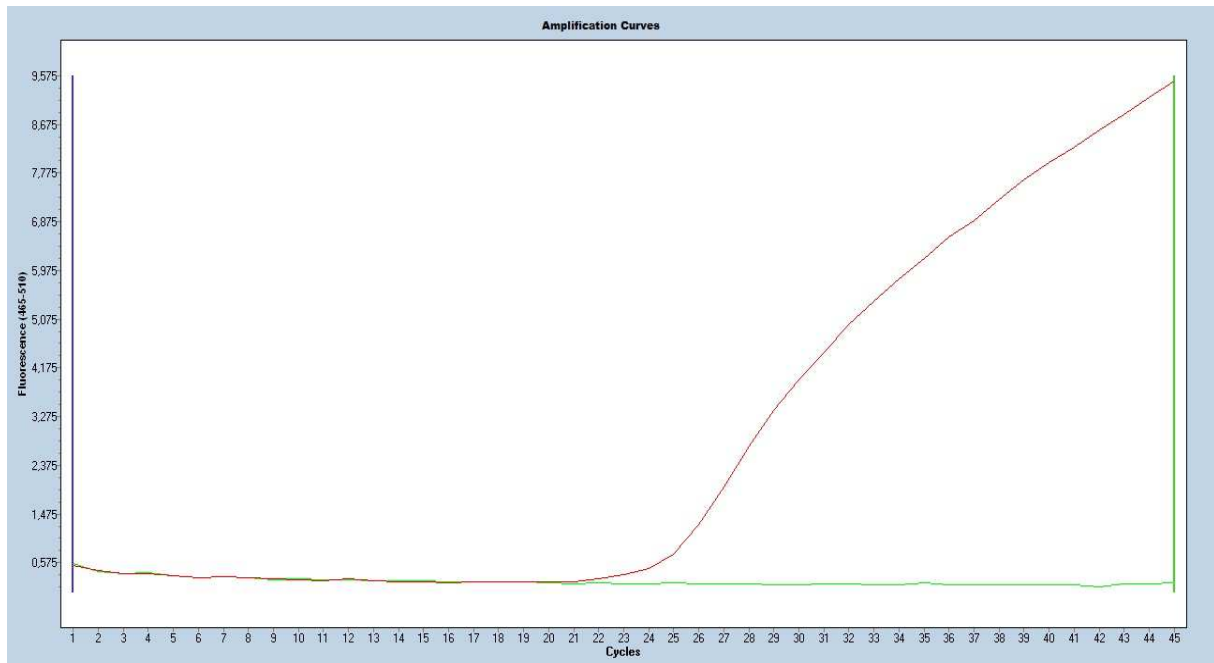


Fig. 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (stx1/stx2) sul LightCycler® 480II

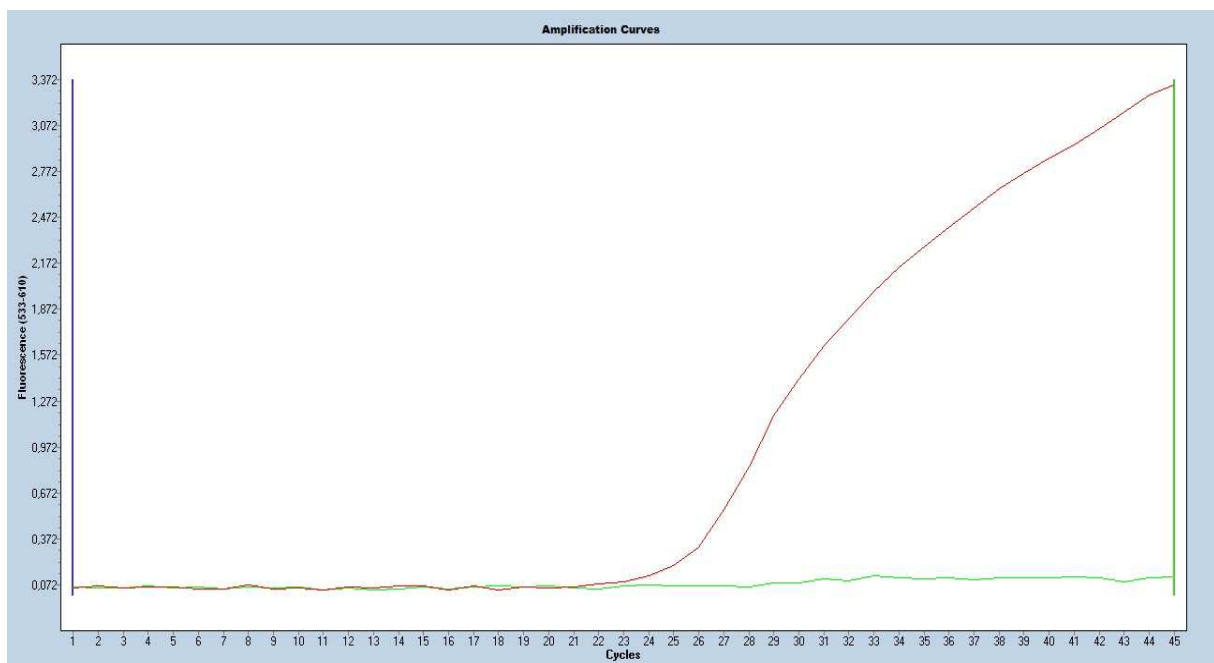


Fig. 2: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (ipaH) sul LightCycler® 480II

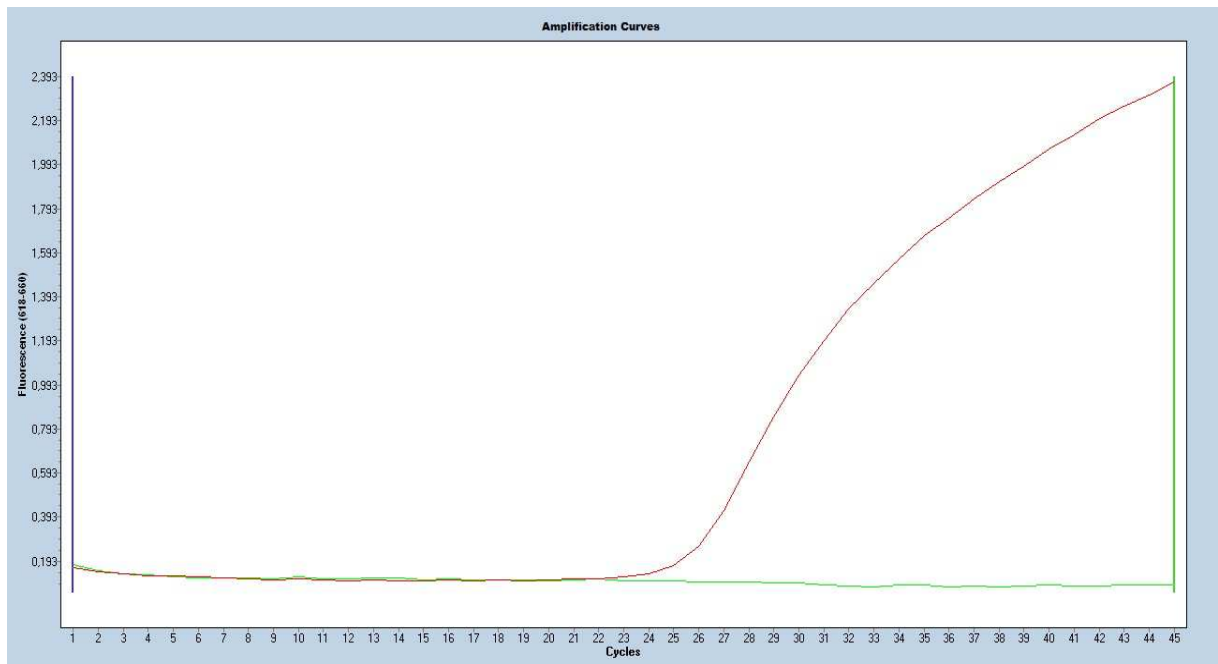


Fig. 3: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (eae) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

Tabella 11: Interpretazione del campione

Geni del fattore di virulenza				
stx1/stx2	ipaH	eae	ICD	Risultato
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	STEC (EHEC) rivelato
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelato
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	EPEC rivelato
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	STEC (EHEC) ed EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelati
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	EHEC rivelato
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. ed EPEC rivelati
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	EHEC ed EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelati
negativo	negativo	negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	negativo	negativo	Non valido

Secondo la legge tedesca sulla protezione dalle infezioni (IfSG) gli EHEC sono gli STEC (*E. coli* produttore di tossina Shiga) patogeni per l'uomo. Poiché non esiste una definizione specifica per gli STEC patogeni umani, ogni STEC deve essere considerato come potenziale EHEC.⁵

Un campione è valutato come negativo se non mostra alcun segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione, ma l'**Internal Control DNA** è positivo. L'inibizione della reazione PCR o un errore nella procedura di estrazione possono essere esclusi dalla rivelazione di **Internal Control DNA**.

Un campione è valutato come positivo se sia il campione sia l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione è valutato come positivo se mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione, ma l'**Internal Control DNA** è negativo. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni

dell'amplicone possono causare un segnale debole o assente del controllo di amplificazione interno.

Un campione è valutato come non valido se sia il campione sia l'**Internal Control DNA** non mostrano alcun segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione conteneva un inibitore della PCR o si è verificato un errore nella procedura di estrazione. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci e colture.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA[®] GENE EHEC/EPEC.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza del gene target (stx1/stx2, ipaH, eae).
8. **La mucina può mostrare proprietà di interferenza anche in piccole quantità.**

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA® GENE EHEC/EPEC ha un limite di rivelazione maggiore o uguale a 10 copie di DNA per reazione per stx1/stx2, ipaH ed eae rispettivamente.

Le figure 4, 5 e 6 seguenti mostrano le serie di diluizioni di stx1/stx2 ipaH ed eae ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl ciascuno) sul LightCycler® 480II.

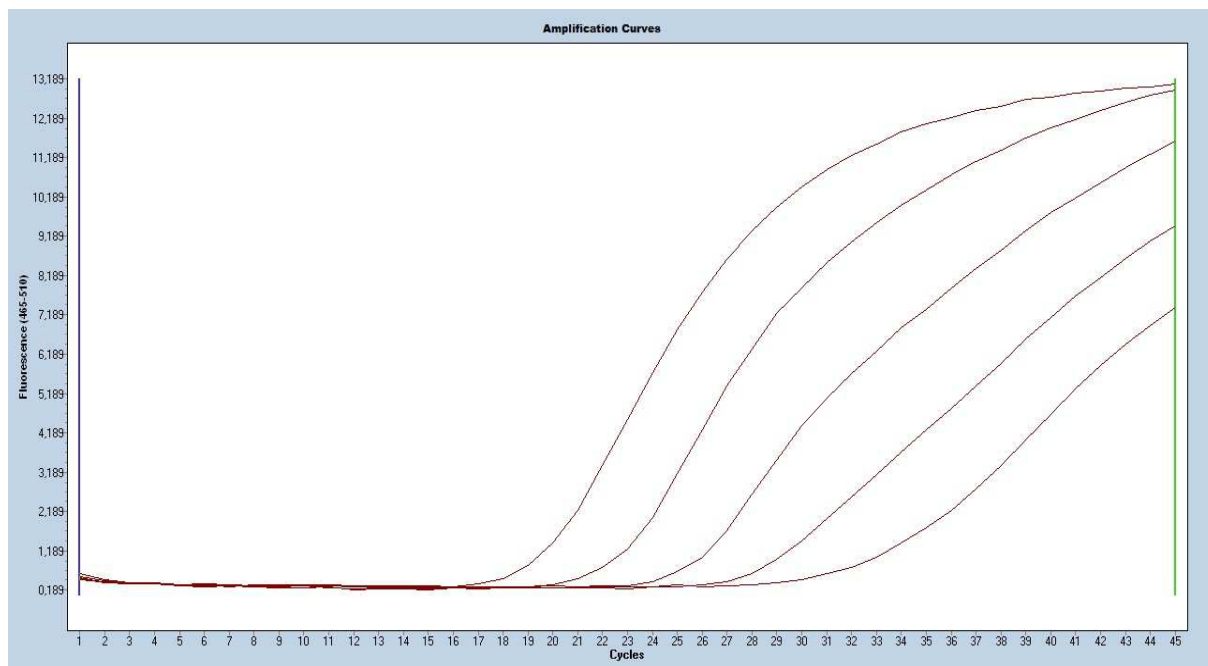


Fig. 4: Serie di diluizioni dei geni della tossina Shiga stx1/stx2 ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler® 480II

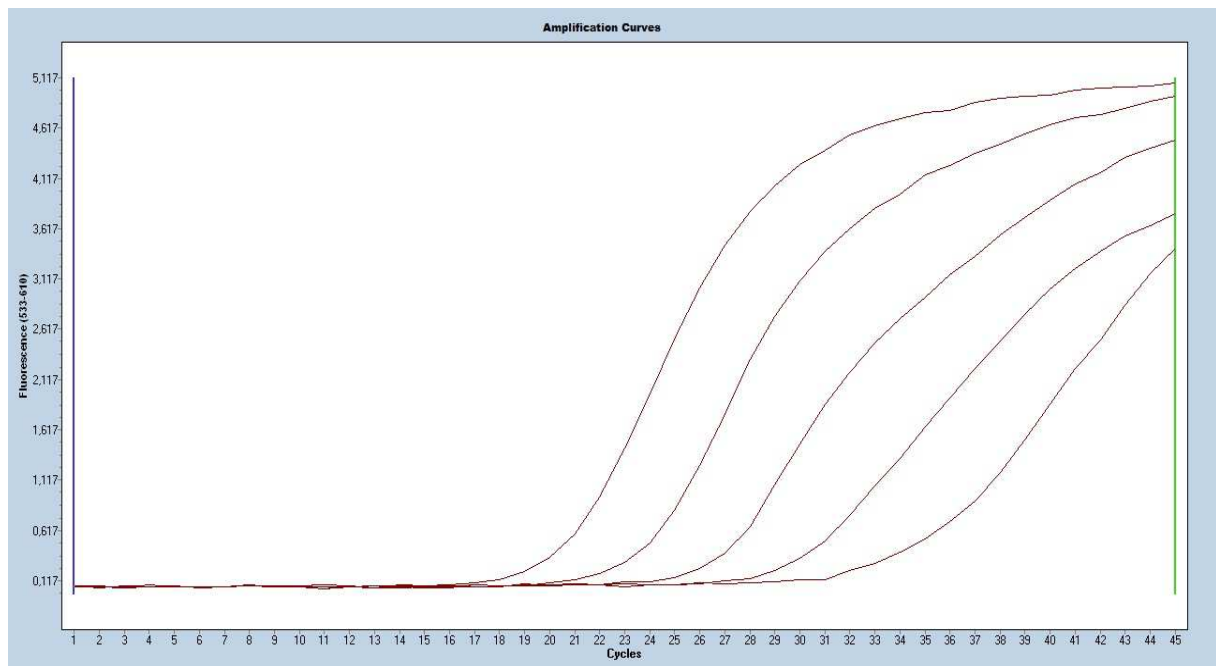


Fig. 5: Serie di diluizioni del gene ipaH ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

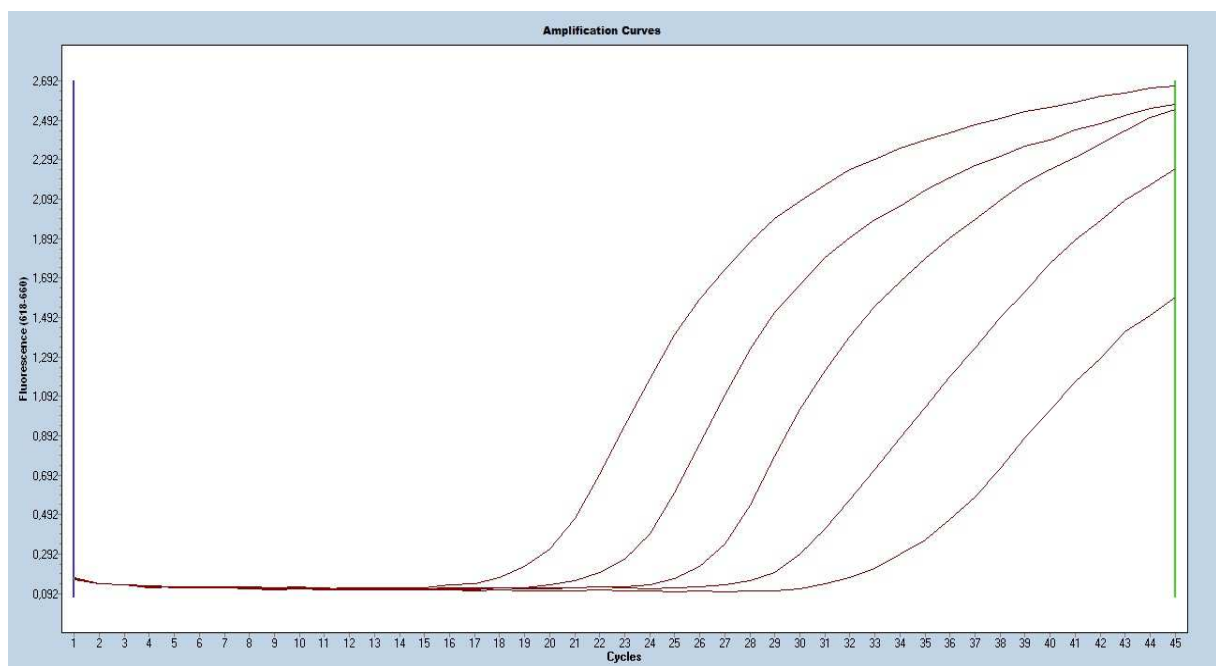


Fig. 6: Serie di diluizioni del gene eae ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

13.2 Specificità analitica

Il test RIDA® GENE EHEC/EPEC di PCR real-time multiplex è specifico per stx1/stx2, ipaH ed eae. Non è stata rivelata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 12).

Tabella 12: Test di reattività crociata

Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo 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> sottosp. <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> sottosp. <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 Clone 6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-				

13.3 Reattività analitica

La reattività del test di PCR real-time RIDA®GENE EHEC/EPEC è stata valutata rispetto a più sottotipi del gene stx1 e stx2 e rispetto ai sottotipi del gene ipaH ed eae (vedere Tabella 13). I seguenti sottotipi di stx1 e stx2 sono stati rivelati dal test di PCR real-time RIDA®GENE EHEC/EPEC:

Tabella 13: Test di reattività analitica










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

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2014-08-14	Versione di rilascio
2018-08-24	Revisione generale
2018-08-24	4. Contenuto della confezione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 8. Raccolta e conservazione di campioni 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 11. Interpretazione del risultato 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel test

Non pertinente

16. Bibliografia

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.