

RIDA®GENE EHEC/EPEC

REF PG2205





1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE EHEC/EPEC é um PCR multiplex em tempo real para a detecção direta e qualitativa e a diferenciação de genes que codificam os fatores de virulência de EHEC, STEC, EPEC, EIEC/Shigella spp. em amostras e culturas de fezes humanas.^{1,2}

RIDA®GENE EHEC/EPEC real-time PCR destina-se ao uso como ajuda no diagnóstico de gastroenterite causada por *Escherichia coli* e *Shigella* spp. patogênicas, respectivamente.

2. Sumário e explicação do teste

Escherichia coli (E. coli) são bactérias em bastão gram-negativas, facultativamente anaeróbicas, que se movem por flagelação perítrica e pertencem à família Enterobacteriaceae. E. coli são parte da flora intestinal normal de humanas e de muitos animais de fazendas, e geralmente são não patogênicas. Algumas cepas de E. coli são patogênicas para humanas através da aquisição de certos fatores de virulência (por ex., genes para toxinas).

As seis conhecidas *E. coli* patogênicas intestinais: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotóxica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) podem ser diferenciadas pelos fatores de virulência.³

Atualmente, as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) são as *E. coli* patogênicas intestinais mais importantes. Todos os anos, são reportados aproximadamente 1.000 casos de doença devido a uma infecção *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) na Alemanha.

As EHEC são um subgrupo da toxina Shiga ou Verotoxina que produz *E. coli* (STEC ou VTEC), e são capazes de produzir duas citotoxinas, Verotoxin 1 e 2. Devido à similaridade das verotoxinas com a toxina Shiga da *Shigella dysenteriae*, as VTECs também são chamadas de STECs. Outro importante fator de virulência no diagnóstico de EHEC é o gene eae ("gene *E. coli* attaching and effacing") que codifica intimina. Detectando o gene ipaH (antígeno plasmídio invasor H), a EHEC/STEC pode ser diferenciada da *Shigella*/EIEC.

Os sintomas clínicos que são causados pela EHEC variam desde diarreias leves até gastroenterites severas e colites hemorrágicas, que ocorrem em, aproximadamente, 10 a 20 % dos casos de infecções. Considerando que de 5 a 10 % das infecções, principalmente em lactentes e crianças pequenas, do mesmo modo em pacientes idosos ou pacientes idosos e com sistema imunológico debilitado, isto também pode levar à síndrome hemolítica-urêmica (HUS) ou púrpura trombocitopênica-trombótica (TTP) como complicação pós-infecciosa de risco de vida. Com a HUS e a TTP, a mortalidade é particularmente alta entre lactentes (aprox. 10 a 15 %). Pode ocorrer falência renal aguda, com dependência temporária de diálise ou a uma perda irreversível da função renal, resultando em dependência permanente de diálise. A intensidade do quadro clínico depende da predisposição do paciente, mas também

do fenótipo correspondente da EHEC. Isto significa que o progresso da doença também depende das diferentes formas nas quais os fatores de virulência são expressados. Fatores que ainda são desconhecidos hoje em dia também desempenham um papel. O período de incubação é de aproximadamente 2 a 10 dias. Devido à alta resistência ambiental e ao contágio, a dose para a EHEC é apenas a cerca de 100 organismos. Fontes de infecção são alimentos contaminados de gado, ovelha ou cabras, principalmente carne crua ou produtos à base carne que não foram aquecidos o suficiente, leite cru não pasteurizado ou certificado, bem como frutas e legumes contaminados. Também são importantes as cadeias de contágio de humano para humano, principalmente em instalações compartilhadas, como jardins de infância, asilos ou hospitais, bem como contatos diretos com animais.^{4,5}

A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) causa diarreia principalmente em crianças pequenas de menos de dois anos de idade. O fator de virulência da EPEC é também o gene eae.⁴

3. Princípio do teste

RIDA[®]GENE EHEC/EPEC é um PCR multiplex em tempo real para a detecção direta e qualitativa e a diferenciação de genes que codificam os fatores de virulência de EHEC, STEC, EPEC, EIEC/Shigella spp.

Depois do isolamento do DNA, ocorre a ampliação dos fragmentos de genes específicos para fatores de virulência stx1/stx2, eae se ipaH (se estiver presente). Os alvos amplificados são detectados com sondas de hidrólise, que estão marcadas em uma extremidade com um supressor e na outra extremidade com um corante repórter florescente (fluoróforo). Na presença de um alvo, as sondas hibridizam para os fragmentos amplificados. Durante a fase de extensão, a Taq-Polymerase quebra a proximidade entre o repórter e o supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade ótica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE EHEC/EPEC contém um Internal Control DNA (ICD) como um monitoramento interno do procedimento de preparação de amostra a fim de determinar a eventual inibição da PCR.

4. Reagentes fornecidos

Tab. 1: Reagentes fornecidos (os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 reações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2x	<mark>1050 μL</mark>	amarelo
2	Taq-Polymerase	1x	<mark>80 μL</mark>	vermelho
D	Internal Control DNA	2x	<mark>1700 μL</mark>	laranja
N	No Template Control	1x	<mark>450 μL</mark>	branco
Р	Positive Control	1x	200 µL	azul

5. Instruções de armazenamento

- Proteja todos os reagentes da luz e armazene a -20 °C. Todos os reagentes podem ser usados até o fim do prazo de validade impresso. Depois de vencido o prazo, a garantia da qualidade já não é válida.
- Descongele cuidadosamente os reagentes antes de usar (por ex., em um frigorífico a 2 - 8 °C).
- Os reagentes podem sustentar até 20 ciclos de congelamento sem influenciar o desempenho do teste (por ex., após o primeiro descongelamento, separe-os em alíquotas e congele-os imediatamente).
- Durante a preparação da PCR, todos os reagentes devem ser conservados a frio de forma adequada (2 8 °C).

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste RIDA®GENE EHEC/EPEC real-time PCR é adequado para ser usado com as seguintes plataformas de extração e instrumentos de PCR em tempo real:

Tab. 2: Equipamento necessário

Plataformas de extração	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS [®] easyMAG [®]
Roche	MagNA Pure
Instrumentos de PCR em tempo real	
Roche	LightCycler [®] 480II, <mark>LightCycler[®] 480 z</mark>
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: No Rotor-Gene Q (QIAGEN), use apenas tubos de 0,1 mL.

Se quiser usar outras plataformas de extração ou instrumentos de PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm em mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para ser usado com o LightCycler® 480II e o LightCycler® 480 z
- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos, película)
- Centrífuga com um rotor para tubos de ensaio
- Vortexer
- Pipetas (0,5 20 μL, 20 200 μL, 100 1000 μL)
- Ponteiras de filtro
- Luvas descartáveis sem pó
- Água PCR (água de grau BioScience, livre de nuclease).

7. Medidas preventivas

Para diagnóstico in vitro.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções de realização do teste deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com membranas mucosas ou pele com hematoma. Durante o manuseio de reagentes ou amostras, vista roupa de segurança adequada (luvas, avental de laboratório e óculos de segurança apropriados), e lave as mãos após concluir a realização do teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras ou reagentes estiverem sendo usados.

- A extração, a preparação da PCR e a execução da PCR devem ser separadas em salas diferentes para evitar contaminações cruzadas.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas, bem como todos os reagentes e materiais expostos às amostras, devendo ser manuseados conforme os regulamentos nacionais de segurança.
- Não use o kit após o prazo de validade.

Todos os reagentes e materiais usados devem ser descartados de modo adequado após o uso. Para o descarte, consulte as normas nacionais relevantes.

Para mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (Safety Data Sheets, SDS) em www.r-biopharm.com

8. Coleta e armazenamento de amostras

8.1 Preparação da amostra de amostras de fezes

Para o isolamento de DNA de amostras de fezes humanas, utilize um kit de extração de DNA disponível no mercado (p. ex., RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou o sistema de extração de DNA (p. ex. Maxwell® RSC (Promega)). Extraia o DNA de acordo com as instruções do fabricante.

Recomendamos a diluição das amostras de fezes em água 1:3 antes de realizar a extração. Agite em vórtice rapidamente a amostra de fezes diluídas e centrifugue a 1000 rpm durante 30 s. Use o volume apropriado a partir do sobrenadante de acordo com as instruções do fabricante.

O teste RIDA®GENE EHEC/EPEC contém um Internal Control DNA que detecta a inibição da PCR, monitora a integridade do reagente e confirma que a extração do ácido nucleico foi suficiente. O Internal Control DNA pode ser utilizado como controle de inibição da PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição da PCR.

Se o Internal Control DNA for usado apenas como controle de inibição da PCR, deve ser adicionado 1 µL de Internal Control DNA à mistura principal (consulte a Tab.4).

Se o Internal Control DNA for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra **e** como controle de inibição da PCR, durante o procedimento de extração, devem ser adicionados 20 µL do Internal Control DNA. O Internal Control DNA deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e <u>não</u> deve ser adicionado diretamente à amostra. Recomendamos também adicionar 1 µL do Internal Control DNA à mistura de PCR do controle negativo e do Internal Control DNA.

8.2 Preparação de amostras a partir de culturas

Para o isolamento de DNA de amostras de cultura, utilize um kit de extração de DNA disponível no mercado (p. ex., RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou o sistema de extração de DNA (p. ex. Maxwell® RSC (Promega)). Extraia o DNA de acordo com as instruções do fabricante.

No isolamento do DNA da cultura, é recomendado o seguinte procedimento: Adicione 1 mL de água PCR em um tubo de preparação. Recolha as colônias com rede de inoculação e suspenda-as no na água PCR preparada. Cortar ou quebrar a haste de rede de inoculação. Feche bem o tubo de preparação e agite fortemente em vórtice durante 60 segundos. Aqueça e agite o tubo de preparação a 95 °C durante 10 min em um bloco de aquecimento. Centrifugue durante 1 min a 13.000 x g e aplique o sobrenadante como amostra.

Nota: Repita a etapa da centrifugação em caso de turvação forte (se necessário).

O teste RIDA®GENE EHEC/EPEC contém um Internal Control DNA que detecta a inibição da PCR, monitora a integridade do reagente e confirma que a extração do ácido nucleico foi suficiente. O Internal Control DNA pode ser utilizado como controle de inibição da PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição da PCR.

Se o Internal Control DNA for usado apenas como controle de inibição da PCR, deve ser adicionado 1 µL de Internal Control DNA à mistura principal (consulte a Tab.4).

Se o Internal Control DNA for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra **e** como controle de inibição da PCR, durante o procedimento de extração, devem ser adicionados 20 µL do Internal Control DNA. O Internal Control DNA deve sempre ser adicionado à mistura amostra-água PCR e <u>não</u> deve ser adicionado diretamente à amostra. Recomendamos também adicionar 1 µL do Internal Control DNA à mistura de PCR do controle negativo e do Internal Control DNA.

9. Realização do teste

9.1 Preparação da mistura principal

Calcule o número total de reações PCR (reações de amostra e de controle) necessárias. Em cada ensaio realizado, devem ser incluídos um Positive Control e um controle negativo.

Recomendamos calcular um volume adicional de 10 % para compensar pipetagens imprecisas (ver Tab. 3, Tab. 4). Antes de usar, descongele, misture cuidadosamente e centrifugue brevemente a Reaction Mix, a Taq-Polymerase, o Positive Control, o No Template Control e o Internal Control DNA. Mantenha os reagentes frios o suficiente durante a etapa (2 - 8 °C).

Tab. 3: Cálculo e exemplo de pipetagem para 10 reações da mistura principal (ICD como extração e controle de inibição da PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (10 % extra)
1	Reaction Mix	<mark>19,3 μL</mark>	<mark>212,3 μL</mark>
2	Taq-Polymerase	<mark>0,7 μL</mark>	<mark>7,7 μL</mark>
	Total	20 μL	220 μL

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifugue brevemente.

Tab. 4: Cálculo e exemplo de pipetagem para 10 reações da mistura principal (ICD apenas como controle de inibição da PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (10 % extra)
1	Reaction Mix	<mark>19,3 μL</mark>	<mark>212,3 µL</mark>
2	Taq-Polymerase	<mark>0,7 μL</mark>	<mark>7,7 μL</mark>
D	Internal Control DNA	1,0 µL	11 µL
	Total	21,0 μL	231,0 μL

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifugue brevemente.

9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µL da mistura principal em cada tubo de ensaio (tubo ou placa).

Controle negativo: Adicione 5 µL de No Template Control à mistura principal

pré-pipetada.

Nota: Se o Internal Control DNA for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 μL do Internal Control DNA à mistura de PCR do controle negativo.

Amostra: Adicione 5 µL de extrato de DNA à mistura principal pré-

pipetada.

Controle positivo: Adicione 5 µL do Positive Control à mistura principal pré-

pipetada.

Nota: Se o Internal Control DNA for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 μL do Internal Control DNA à mistura de PCR do controle positivo.

Cubra os tubos ou a placa. Centrifugue e coloque no instrumento de PCR em tempo real. A reação de PCR deve ser iniciada de acordo com as definições do instrumento de PCR (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Configuração do instrumento de PCR

9.3.1 Perfil de PCR em tempo real do DNA

Tab. 5: Perfil de PCR em tempo real do DNA para LightCycler® series e Rotor-Gene Q

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Tempo máximo

Nota: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

Tab. 6: Perfil de PCR em tempo real de DNA para Mx3005P, ABI 7500 e CFX96™

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturação Recozimento/Extensão	15 s, 95 °C 30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Tempo máximo

Nota: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

9.3.2 Perfil de PCR em tempo real universal

Nota: O perfil de PCR em tempo real universal deve ser utilizado apenas em testes de DNA quando houver a combinação dos testes RIDA®GENE DNA e PCR em tempo real de RNA em uma execução.

Tab. 7: Perfil de PCR em tempo real universal para LightCycler[®] series

Transcrição reversa	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Tempo máximo

Nota: O Recozimento e a Extensão ocorrem na mesma etapa.

Tab. 8: Perfil de PCR em tempo real para Mx3005P, ABI 7500 , Rotor-Gene Q e CFX96™

Transcrição reversa	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Tempo máximo

Nota: O Recozimento e a Extensão ocorrem na mesma etapa.

9.4 Configuração dos canais de detecção

Tab. 9: Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Detecção	Canal de detecção	Indicação
	stx1/stx2	465/510	É necessário o
Roche	ICD	533/580	RIDA®GENE Color
LightCycler® 480II	ipaH	533/610	Compensation Kit IV
	eae	618/660	(PG0004)
	stx1/stx2	<mark>465/510</mark>	É necessário o
Roche	ICD	<mark>540/580</mark>	RIDA®GENE Color
LightCycler® 480 z	<mark>ipaH</mark>	<mark>540/610</mark>	Compensation Kit IV
<u></u>	eae	<mark>610/670</mark>	(PG0004)
	stx1/stx2	FAM	
Agilent Techn.	ICD	HEX	Verificar se não é
Mx3005P	ipaH	ROX	corante de referência
	eae	Cy5	
	stx1/stx2	FAM	_
ABI 7500	ICD	VIC	Verifique se a opção de referência passiva ROX
ADI / 500	ipaH	ROX	está em nenhum
	eae	Cy5	
	stx1/stx2	FAM	
Bio-Rad	ICD	VIC	
CFX96™	іраН	ROX	-
	eae	Cy5	
	stx1/stx2	Verde	As configurações de
Qiagen Rotor-GENE	ICD	Amarelo	ganho devem ser definidas em 5 de
Q	іраН	Laranja	acordo com as
	eae	Vermelho	configurações padrão

10. Controle de qualidade

A análise das amostras é efetuada pelo software do instrumento de PCR em tempo real usado conforme as instruções do fabricante. O controle positivo e o controle negativo devem mostrar resultados corretos (ver a Tabela 10, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3), para poder determinar uma execução válida.

O Positive Control tem uma concentração de 10³ cópias/µL. Em cada execução da PCR, ele é usado em um valor total de 5 x 10³ cópias.

Tab. 10: Para uma execução válida, é necessário preencher as seguintes condições:

Amostra	Resultado do ensaio	ICD Ct	Ct Alvo
Controle positivo	Positivo	NA *1	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	0

^{*1} Não é necessário um valor de Ct para o ICR para obter um resultado positivo do controle positivo.

Se o controle positivo não for positivo dentro do intervalo de Ct especificado, mas o Controle negativo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

Se os critérios exigidos não forem preenchidos, os itens a seguir devem ser verificados antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade da instrumentação utilizada
- Desempenho correto de realização do teste

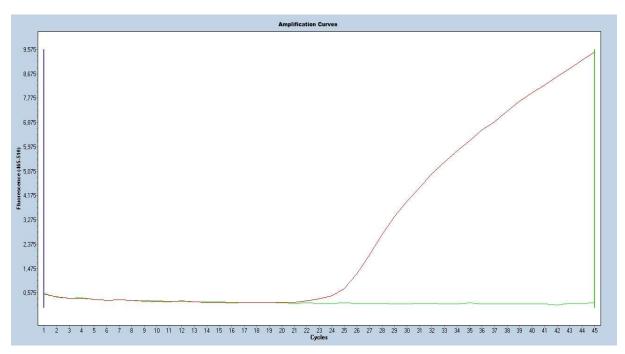


Fig. 1: Execução correta dos controles positivo e negativo (stx1/stx2) no LightCycler® 480II

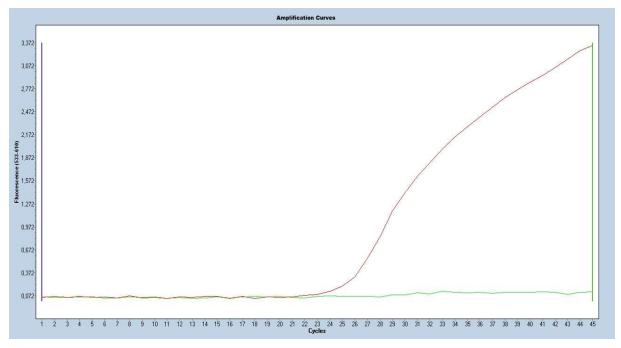


Fig. 2: Execução correta dos controles positivo e negativo (ipaH) no LightCycler® 480II

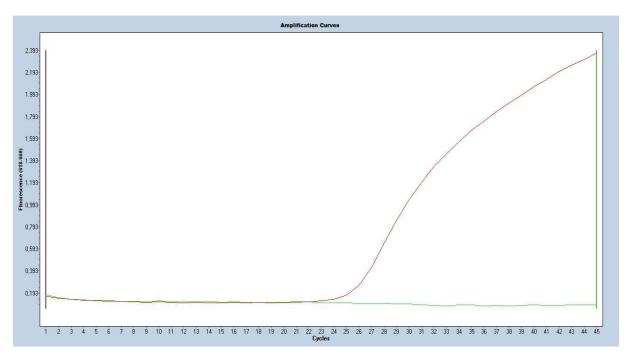


Fig. 3: Execução correta dos controles positivo e negativo (eae) no LightCycler® 480II

11. Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a tabela 11.

Tab.11: Interpretação das amostras

Genes de fator de virulência				
stx1/stx2	іраН	eae	ICD	Resultado
positivo	negativo	negativo	positivo/ negativo	STEC (EHEC) detectada
negativo	positivo	negativo	positivo/ negativo	EIEC/Shigella spp. detectada
negativo	negativo	positivo	positivo/ negativo	EPEC detectada
positivo	positivo	negativo	positivo/ negativo	STEC (EHEC) e EIEC/Shigella spp. detectadas
positivo	negativo	positivo	positivo/ negativo	EHEC detectada
negativo	positivo	positivo	positivo/ negativo	EIEC/Shigella spp. e EPEC detectadas
positivo	positivo	positivo	positivo/ negativo	EHEC e EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detectadas
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes alvo não detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	Inválido

De acordo com a Lei Alemã de Proteção contra Infecções (IfSG), EHEC são aqueles STEC (*E. coli* que produzem a toxina Shiga), que são patogênicos para humanos. Como não existe nenhuma definição específica para STEC patogênico para humanos, cada STEC deve ser considerado um potencial EHEC.⁵

Uma amostra é considerada negativa se a amostra não apresentar nenhum sinal de amplificação no sistema de detecção, mas o DNA de Internal Control DNA for positivo. Uma inibição da reação PCR ou uma falha no procedimento de extração podem ser excluídas através da detecção do Internal Control DNA.

Uma amostra é considerada positiva, se a amostra de DNA e o Internal Control DNA apresentarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

Uma amostra é considerada positiva, se a amostra apresentar um sinal de amplificação no sistema de detecção, mas o Internal Control DNA for negativo. A detecção do controle de amplificação interno não é necessária, porque as altas

concentrações do fragmento amplificado podem causar um sinal fraco ou ausente do controle de amplificação interno.

Uma amostra é considerada inválida, se a amostra e o Internal Control DNA não apresentarem nenhum sinal de amplificação no sistema de detecção. A amostra continha um inibidor de PCR ou ocorreu uma falha no procedimento de extração. A amostra extraída precisa ser diluída adicionalmente com água PCR (1:10) e reamplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

12. Limitações do método

- O resultado da análise molecular não deve levar ao diagnóstico, mas sim ser sempre considerado no contexto do histórico médico e dos sintomas do paciente.
- 2. Este teste só é validado para amostras e culturas de fezes.
- 3. A coleta, o transporte, o armazenamento e o processamento inadequados da amostra ou uma carga patogênica na amostra inferior à sensibilidade analítica podem resultar em resultados falso negativos.
- 4. A presença de inibidores de PCR pode causar resultados inválidos.
- 5. Mutações ou polimorfismos na primeira coleta ou regiões de ligação de sonda podem afetar a detecção de novas variantes, gerando um resultado falso negativo com o teste RIDA®GENE EHEC/EPEC.
- 6. Do mesmo modo que em todos os testes de diagnóstico *in vitro* com base em PCR, é possível detectar os níveis de alvo extremamente baixos, inferiores ao limite de detecção (LoD), mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- 7. Um resultado positivo dos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. No entanto, um resultado positivo indica a presença dos genes alvo (stx1/stx2, ipaH, eae).
- 8. A mucina pode mostrar características interferentes já em pequenas quantidades.

13. Características de desempenho

13.1 Sensibilidade analítica

RIDA®GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR tem um limite de detecção de ≥ 10 DNA cópias por reação para stx1/stx2, ipaH e eae, respectivamente.

As seguintes figuras 4, 5 e 6 apresentam uma série de diluição de stx1/stx2, ipaH e eae (10⁵ - 10¹ cópias de DNA cada por µL) no LightCycler[®] 480II.

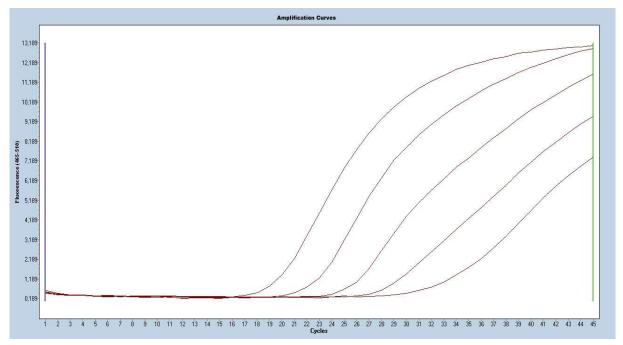


Fig. 4: Série de diluição de genes da toxina Shiga stx1/stx2 (10⁵ - 10¹ cópias de DNA/μL) no LightCycler[®] 480II

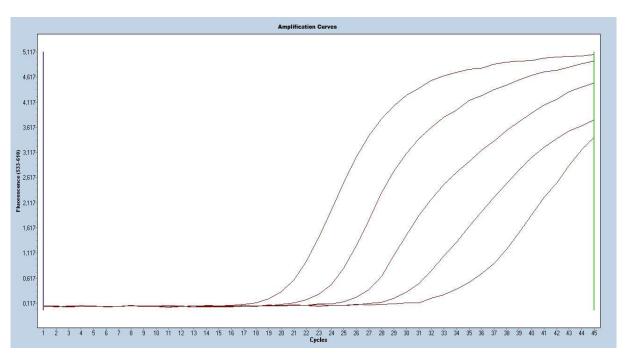


Fig. 5: Séries de diluição do gene ipaH (10⁵ - 10¹ cópias de DNA/μL) no LightCycler[®] 480II

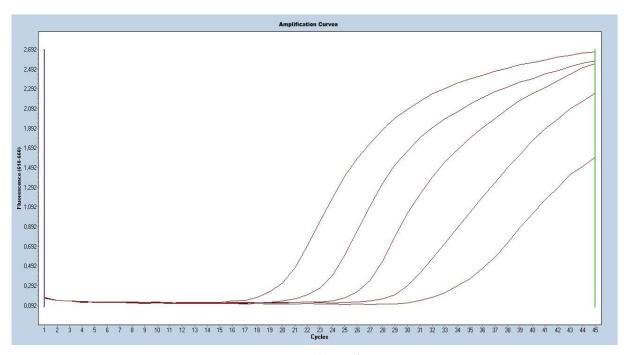


Fig. 6: Séries de diluição do gene eae (10⁵ - 10¹ cópias de DNA/μL) no LightCycler[®] 480II

O limite de detecção de todo o procedimento depende da matriz da amostra, da extração de DNA e da concentração de DNA.

13.2 Especificidade analítica

RIDA®GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR é específica para stx1/stx2, ipaH e eae. Não foi detectada nenhuma reação cruzada em relação às seguintes espécies (ver Tab. 12).

Tab. 12: Testes de reatividade cruzada

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

13.3 Reatividade analítica

A reatividade de RIDA®GENE EHEC/EPEC real-time PCR foi avaliada em comparação com vários subtipos do gene stx1 e stx2 bem como subtipos do gene ipaH e eae (ver a Tab. 13). Os subtipos de stx1 and stx2 abaixo são detectados pela RIDA®GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR:

Tab.13: Testes de reatividade analítica

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

14. Histórico de versões

Número da versão	Capítulo e designação		
2014-08-14	Versão da edição		
2018-08-24	Revisão geral		
<mark>2018-08-24</mark>	4. Reagentes fornecidos		
	6. Reagentes necessários, mas não fornecidos		
	8. Coleta e armazenamento de amostras		
	9. Realização do teste		
	10. Controle de qualidade		
	11. Interpretação dos resultados		
	13. Características de desempenho		
	14. Histórico de versões		
	15. Explicação dos símbolos		

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

IVD	Para diagnóstico <i>in vitro</i>
(i)	Respeitar as instruções de utilização
LOT	Número de lote
Σ	Válido até
*	Temperatura de conservação
REF	Referência do produto
$\overline{\Sigma}$	Número de testes
~√	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

Não aplicável

16. Literatura

- 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.