

RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I

REF PG2415



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE Bacterial Stool Panel I es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de ECTS, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y ECEI/*Shigella* spp. en muestras de heces humanas.

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel I está concebido como una ayuda para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales causadas por bacterias.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las enfermedades diarreicas son un gran problema de salud que causa alrededor de 2,000 millones de casos en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las enfermedades diarreicas como la segunda causa más común de muertes infantiles entre niños menores de 5 años a nivel mundial, en particular en los países en desarrollo. Cada año mueren de diarrea aproximadamente 1.9 sarampión juntos.^{1,2} *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Y. enterocolitica* son causantes comunes de las enfermedades diarreicas bacterianas.

Las especies de *Campylobacter* son una de las causas más comunes de diarrea bacteriana en todo el mundo, responsables de 400 a 500 millones de casos anualmente. La enfermedad causada por el género *Campylobacter* se denomina campilobacteriosis. Más del 80% de las infecciones por *Campylobacter* son causadas por *C. jejuni*. En los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos se calcula que en ese país hay más de 2 millones de casos de campilobacteriosis al año. La Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) (Red de vigilancia activa de enfermedades transmitidas por los alimentos) informó una tasa de incidencia de 13 casos por 100,000 habitantes en 2008. Se detectó *C. jejuni* en entre 5% y 16% de los niños con diarrea en países desarrollados, y en entre 8% - 45% de los niños con diarrea en los países en desarrollo.⁴ Cada año mueren en Estados Unidos aproximadamente 100 personas con infecciones por *Campylobacter*.^{3,4} La infección por *Campylobacter* se produce a través de alimentos contaminados, en especial la carne de aves, el agua, el contacto con animales infectados o por vía fecal-oral, particularmente en niños. La dosis infecciosa, de 500 bacterias, es relativamente baja. Tras un periodo de incubación de entre 2 a 5 días, las personas con campilobacteriosis desarrollan fiebre, diarrea, calambres abdominales, vómito, dolor abdominal y náuseas. Las posibles complicaciones a largo plazo son los trastornos autoinmunitarios, como el síndrome de Guillain-Barré (SGB).⁴

Las especies de *Salmonella* son también una de las causas principales de la gastroenteritis bacteriana a nivel mundial. El género *Salmonella* se divide en dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. Hasta ahora, se han descrito más de 2,500 serotipos de *Salmonella* que son patogénicos para los humanos. Las especies de *Salmonella* provocan salmonelosis no tifoidea o fiebre tifoidea. Se estima que cada

año se producen mundialmente 93.8 millones de casos de infecciones de salmonelosis no tifoidea, con 155,000 muertes.⁶ En los CDC se calcula que hay más de 1.2 millones de casos anuales de infecciones de salmonelosis no tifoidea en Estados Unidos, con más de 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes.⁵ La mayoría de las infecciones de salmonelosis no tifoidea son causadas por *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, mientras que la fiebre tifoidea es causada por *S. typhi* y *S. paratyphi* A, B o C. En los CDC se estima que, anualmente, hay más de 1,800 casos de fiebre tifoidea en Estados Unidos. La transmisión de *Salmonella* ocurre a través de la comida contaminada, el agua o el contacto con animales infectados. La dosis infecciosa de las especies de *Salmonella* varía de entre 1 a 1,000 bacterias. La infección de salmonelosis no tifoidea se produce tras un periodo de incubación de entre 6 a 72 horas con síntomas clínicos de náuseas, vómito, calambres abdominales, diarrea, fiebre y cefalea. Las personas con fiebre tifoidea desarrollan cefalea, dolores, fiebre alta (de 39°C a 41°C), síntomas gastrointestinales, como dolores abdominales y diarrea, en un plazo de entre 1 a 3 semanas después de la exposición al microorganismo.^{3, 7}

Una de las seis especies patogénicas y bien conocidas de *E. coli* es la *E. coli* enteroinvasiva (ECEI). En los países en desarrollo, y también en los viajeros que regresan de esos países, ECEI puede provocar infecciones similares a la shigelosis, ya que tiene un vínculo estrecho bioquímica y genéticamente con *Shigella* spp. La patogenicidad de ECEI y también la de *Shigella* spp. están en función de la capacidad dependiente de plásmidos para invadir las células epiteliales del colon y destruirlas.

ECEI/*Shigella* spp. se puede distinguir de ECTS mediante la detección del gen ipaH (gen del antígeno del plásmido de invasión H).

Los síntomas clínicos de la shigelosis causada por ECEI se caracterizan por calambres abdominales continuos con diarrea acuosa y, a veces, sanguinolenta. Las fuentes de infección son principalmente el agua y los alimentos contaminados, pero también se puede transmitir entre humanos.

Además de ECEI/*Shigella* spp., también la *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) desempeña un papel importante. En Alemania se informa anualmente de unas 1,000 infecciones por ECEH.

ECEH es un subgrupo de las *E. coli* productoras de toxina Shiga (ECTS o ECVT) y tiene la capacidad para producir dos toxinas, las verotoxinas 1 y 2. Debido a la estrecha similitud entre las verotoxinas y las toxinas Shiga de *Shigella dysenteriae*, ECVT también se denomina ECTS.

El método clásico de laboratorio para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales bacterianas es el cultivo, que toma varios días.

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel I es un método alternativo y atractivo para analizar las muestras de heces, y ha demostrado ser altamente sensible y específico para la detección simultánea de las cuatro bacterias más importantes que causan diarrea (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y ECEI/*Shigella* spp.).

3. Principio del ensayo

El ensayo RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel I es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y ECEI/*Shigella* spp. Después de aislar el ADN, los fragmentos génicos específicos de ECTS (stx1/stx2), *Salmonella* spp. (ttr), *Campylobacter* spp. (16s ADNr) y ECEI/*Shigella* spp. (ipaH) se amplifican, 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 Bacterial Stool Panel I 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 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1,050 µl	amarilla
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	roja
D	Internal Control DNA	2x	1,700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanca
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. 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 5 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 (2°C a 8°C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel I es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2 Equipamiento necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC (Promega)
Equipo de PCR en tiempo real:	
Roche	LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P (con filtro ATTO)

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
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador 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 del ensayo. 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 del ensayo. 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 (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.

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 1,000 x g durante 30 segundos. Use el volumen adecuado de sobrenadante según las instrucciones del fabricante.

El kit de PCR en tiempo real RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel I contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitoriza 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 utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se deben añadir 20 µl del **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.

9. Ejecución del ensayo

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 debe incluirse un control positivo y un No Template Control.

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 el paso 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 para PCR

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

Control negativo: Agregue 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 **No Template Control**.

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

Control positivo: Añada 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 4, 5, 6 y 7).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil por PCR en tiempo real en el LightCycler® 480II

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 por PCR en tiempo real en el Mx3005P

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 LightCycler® 480II

<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

<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	ECTS	440/488	Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	
	ICD	533/580	
	ECEI/ <i>Shigella</i> spp.	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	ECTS	ATTO	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno)
	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	
	ICD	HEX	
	ECEI/ <i>Shigella</i> spp.	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	

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, 3 y 4) para determinar una corrida válida.

El **Positive Control** de ECTS, *Salmonella* spp., ECEI/*Shigella* spp. y *Campylobacter* spp. tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada corrida de PCR se usa una cantidad total de 5×10^3 copias, respectivamente.

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

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de genes 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 ICD 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 del ensayo

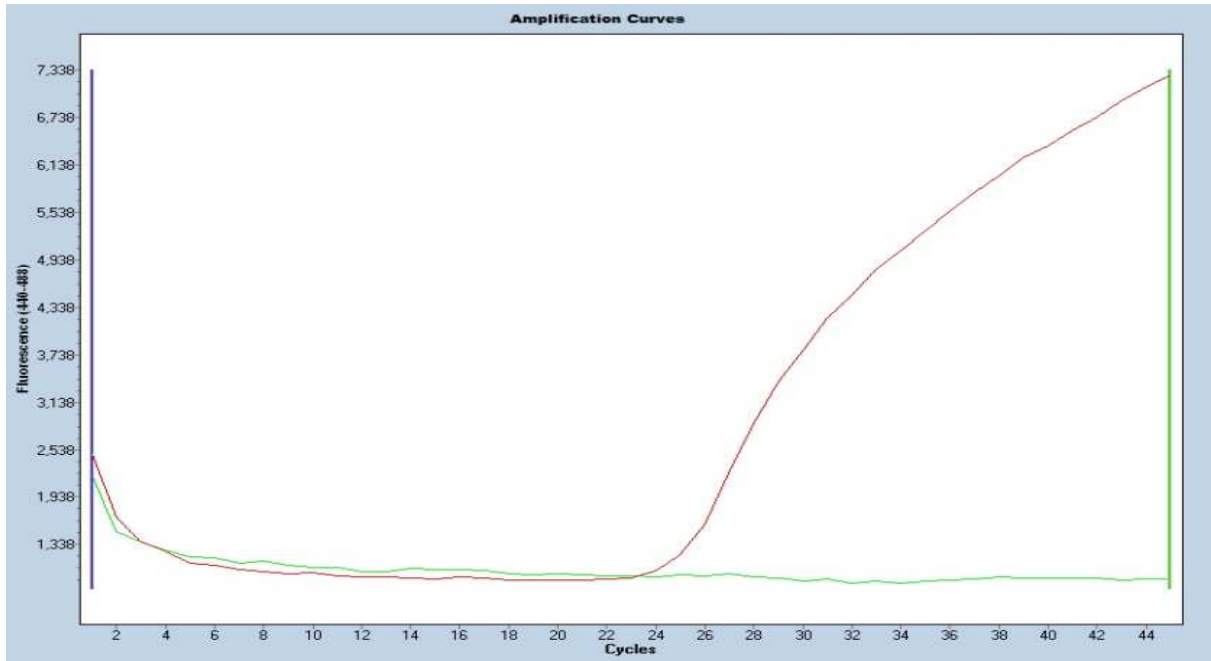


Fig. 1: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (*no template control*) (ECTS) en el LightCycler® 480II

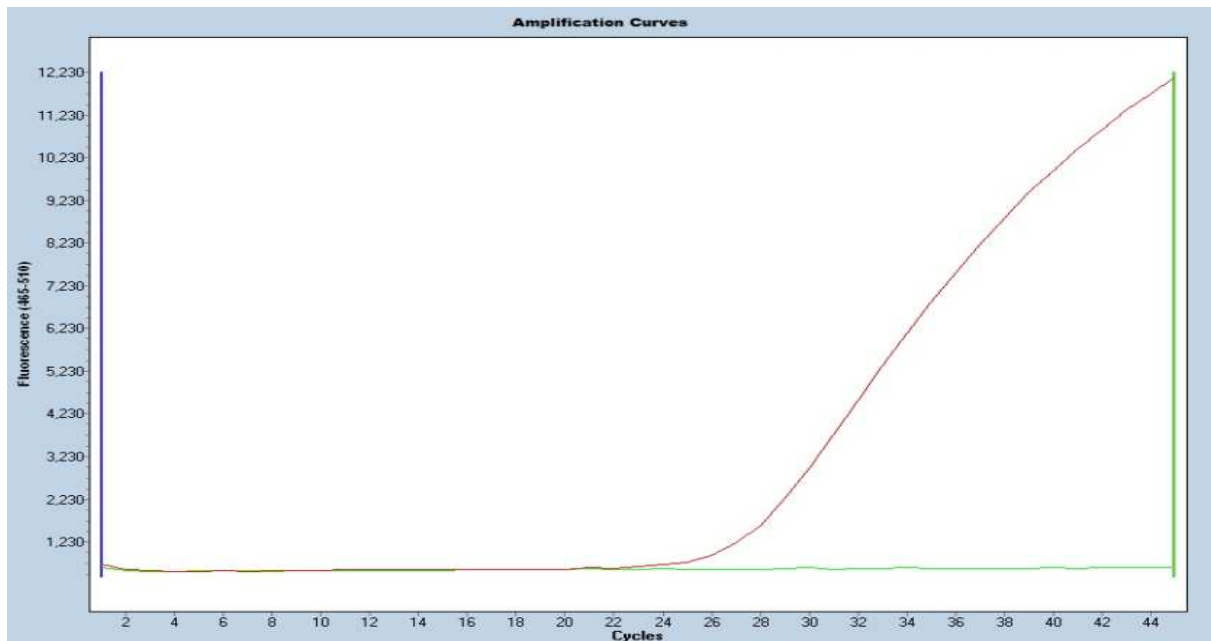


Fig. 2: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (*no template control*) (*Salmonella* spp.) en el LightCycler® 480II

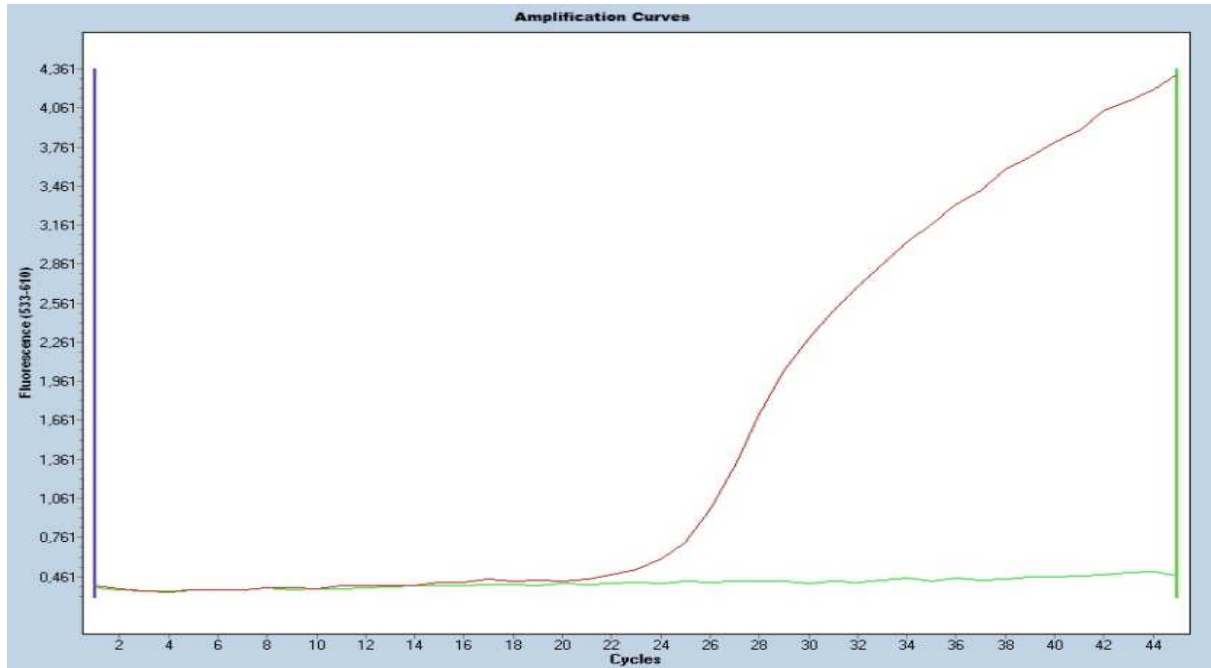


Fig. 3: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (*no template control*) (ECEI/*Shigella* spp.) en el LightCycler® 480II

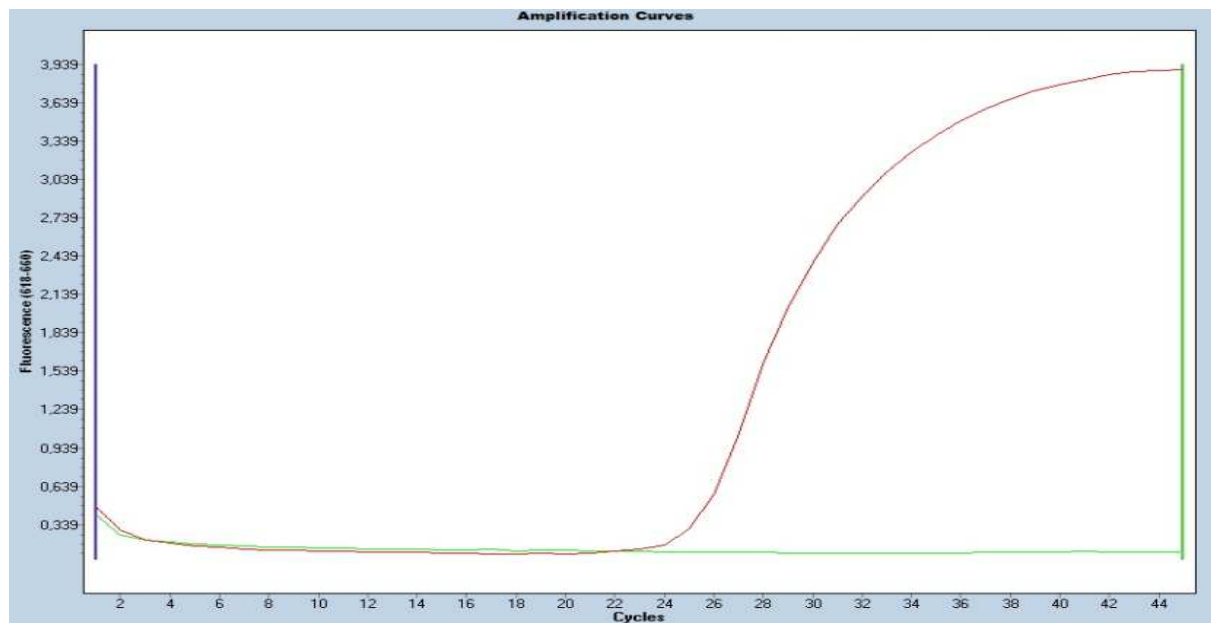


Fig. 4: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (*no template control*) (*Campylobacter* spp.) en el LightCycler® 480II

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 diana					
ECTS	<i>Salmonella</i> spp.	ECEI/ <i>Shigella</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.	ICD	Resultado
positivo	negativo	negativo	negativo	positivo/negativo	ECTS detectado
negativo	positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp. detectado
negativo	negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	ECEI/ <i>Shigella</i> spp. detectado
negativo	negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Campylobacter</i> spp. detectado
positivo	positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	ECTS, <i>Salmonella</i> spp. detectado
positivo	negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	ECTS, ECEI/ <i>Shigella</i> spp. detectados
positivo	negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	ECTS, <i>Campylobacter</i> spp. detectados
positivo	positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	ECTS, <i>Salmonella</i> spp., ECEI/ <i>Shigella</i> spp. detectados
positivo	negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	ECTS, ECEI/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. detectados
positivo	positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	ECTS, <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. detectados
negativo	positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp., ECEI/ <i>Shigella</i> spp. detectados
negativo	positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. detectados
negativo	positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp., ECEI/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. detectados
negativo	negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	ECEI/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. detectados
positivo	positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	ECTS, <i>Salmonella</i> spp., ECEI/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

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 es inválida si, tanto la muestra como el **Internal Control DNA**, no presentan ninguna 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.
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 polimorfismo 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 Bacterial Stool Panel I.
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 (LoD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia de los respectivos genes diana (stx1/2, ttr, 16s ADNr, ipaH).

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción para ECTS, *Salmonella* spp., ECEI/*Shigella* spp. y *Campylobacter* spp.

Las siguientes figuras 5, 6, 7 y 8 muestran una dilución seriada de ECTS, *Salmonella* spp., ECEI/*Shigella* spp. y *Campylobacter* spp. (10^5 a 10^1 copias de ADN por μl en cada caso) en el LightCycler® 480II.

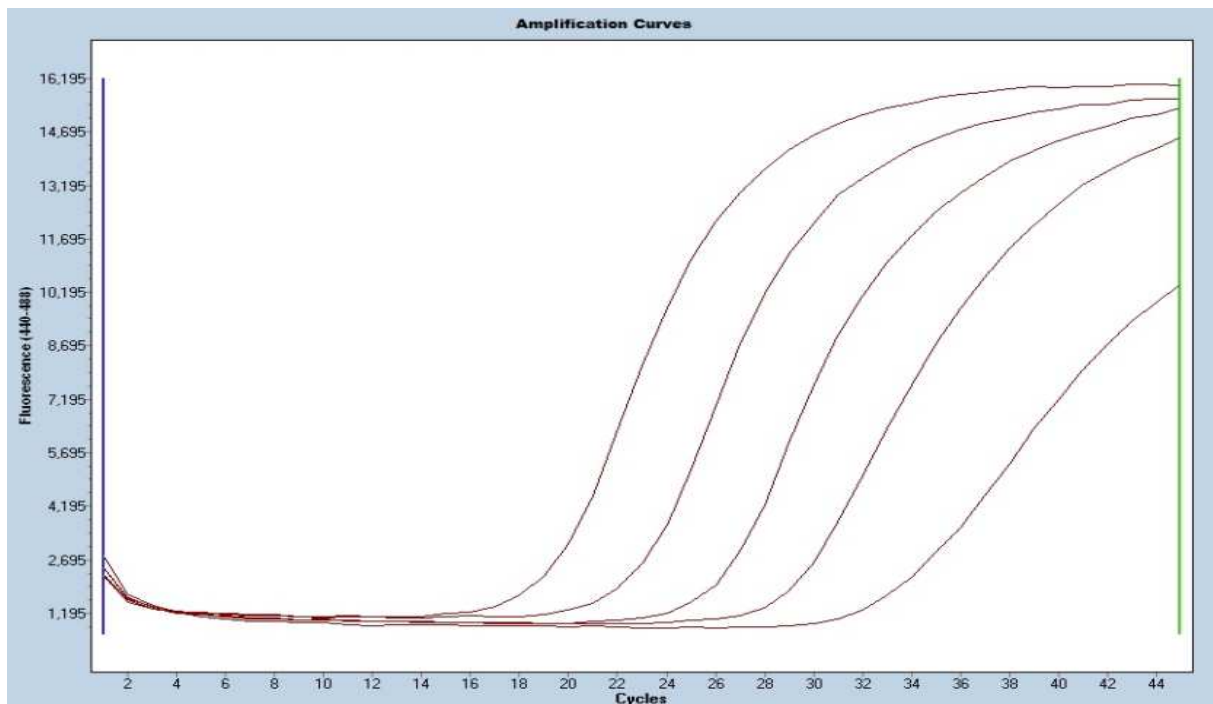


Fig. 5: Dilución seriada de ECTS (10^5 a 10^1 copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

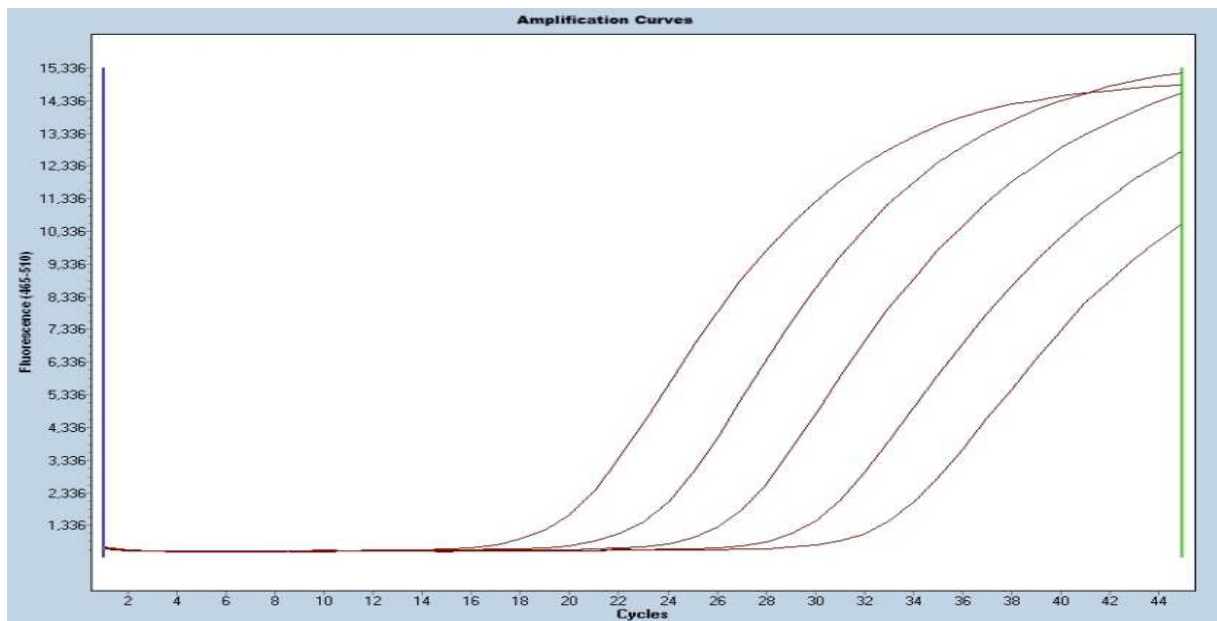


Fig. 6: Dilución seriada de *Salmonella* spp. (10^5 a 10^1 copias de ADN por μ l) en el LightCycler[®] 480II

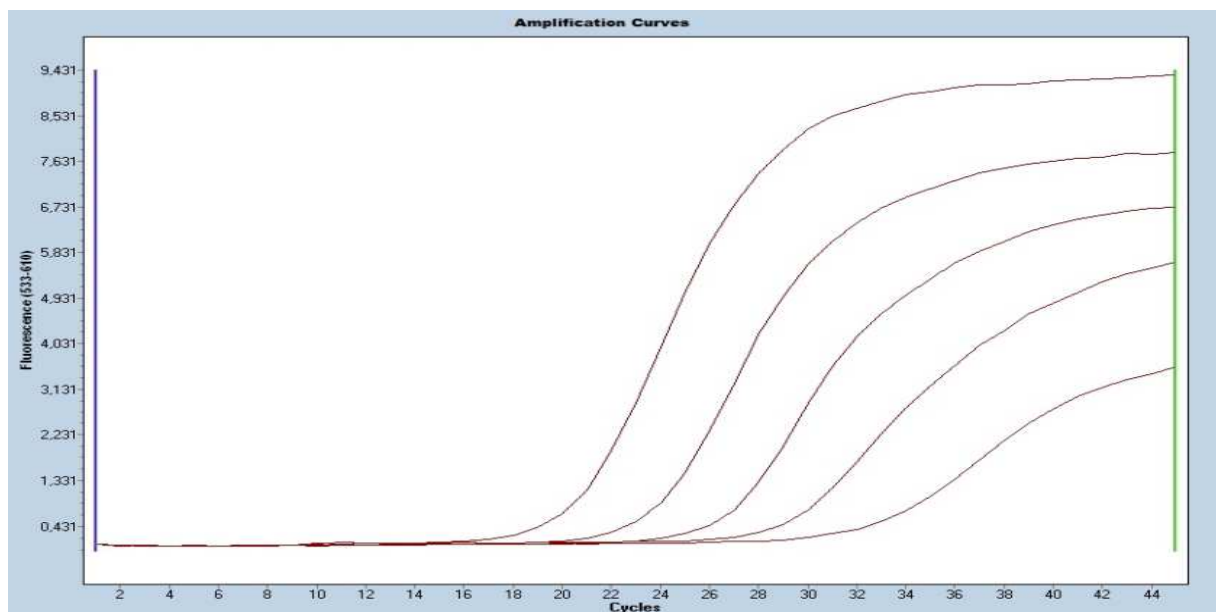


Fig. 7: Dilución seriada de ECEI/*Shigella* spp. (10^5 a 10^1 copias de ADN por μ l) en el LightCycler[®] 48

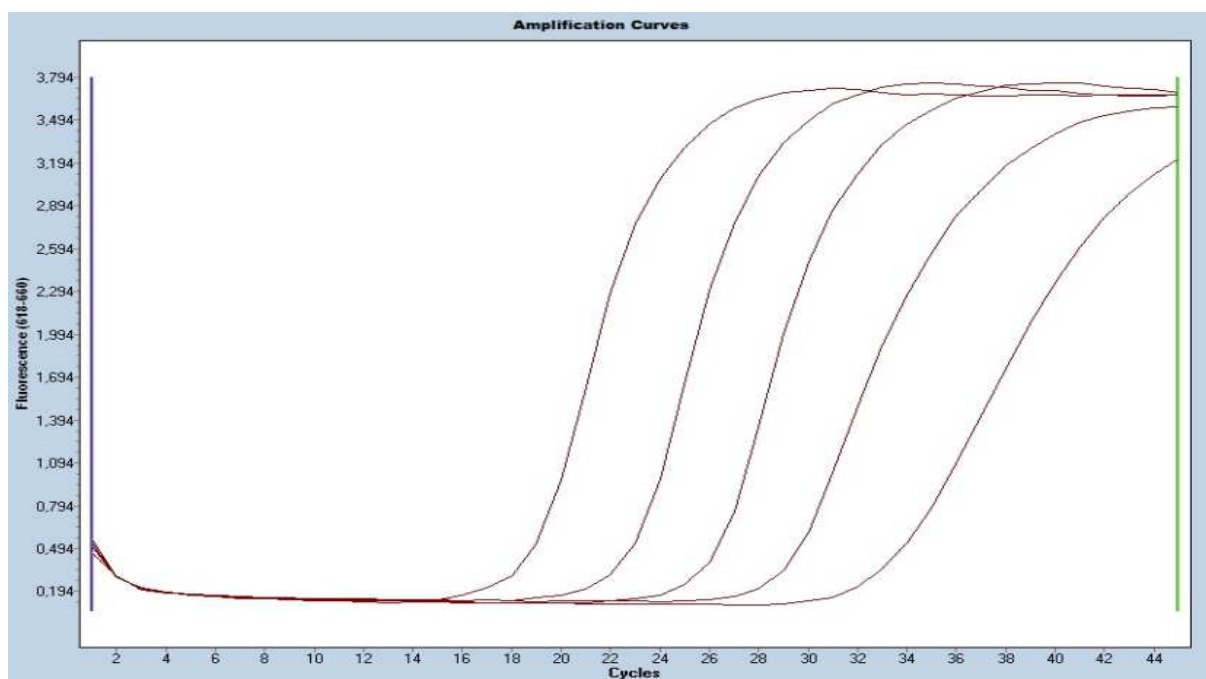


Fig. 8: Dilución seriada de *Campylobacter* spp. (10^5 a 10^1 copias de ADN por μl) en el LightCycler[®] 480II

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 Bacterial Stool Panel I es específico para ECTS, *Salmonella* spp., ECEI/*Shigella* spp. y *Campylobacter* spp. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12):

Tabla 12: Ensayos de reactividad cruzada

Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG I	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG II	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon 6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-						

13.3 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel I se evaluó contra varios subtipos stx1/stx2, especies de *Campylobacter*, serotipos de *Salmonella* y ECEI/*Shigella* spp. (consulte la tabla 13). El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel I detectó todos los genogrupos de ECTS, especies de *Campylobacter*, serotipos de *Salmonella* y ECEI/*Shigella* spp. del panel.

Tabla 13: Ensayos de reactividad cruzada










Subtipos stx1					
stx1a	+	stx1c	+	stx1d	+
Subtipos stx2					
stx2a	+	stx2d	+	stx2g	+
stx2b	+	stx2e	+		
stx2c	+	stx2f	+		
Especies de <i>Campylobacter</i>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+	<i>C. lari</i>	+
Serotipos de <i>Salmonella</i>					
<i>S. augustinbourg</i>	+	<i>S. ealing</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+
<i>S. abony</i>	+	<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. newport</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. essen</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+
<i>S. amsterdam</i>	+	<i>S. glostrup</i>	+	<i>S. ohio</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. gloucester</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. goldcoast</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. bareilly</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. poona</i>	+
<i>S. berta</i>	+	<i>S. haifa</i>	+	<i>S. pullorum</i>	+
<i>S. blegdam</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. rostock</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bovismorbificans</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. brandenburg</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. senftenberg</i>	+
<i>S. caracas</i>	+	<i>S. kentucky</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. chloeraesius</i>	+	<i>S. kiel</i>	+	<i>S. virchow</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. livingston</i>	+	<i>S. wernigerode</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. wilhelmsburg</i>	+
<i>S. dublin</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. duesseldorf</i>	+	<i>S. moscow</i>	+		
<i>Shigella</i>					
<i>S. boydii</i>	+	<i>S. dysenteriae</i>	+	<i>S. flexneri</i>	+
<i>S. sonnei</i>	+				

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2015-06-15	Versión de lanzamiento
2018-06-06	Revisión general
2018-06-06	4. Reactivos suministrados 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 9. Ejecución del ensayo 10. Control de calidad 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 ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Referencias bibliográficas

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