

RIDA® UNITY EHEC/EPEC

REF UN2205



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemania

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Uso previsto

Para el uso diagnóstico *in vitro*. La prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC, realizada en la plataforma RIDA®UNITY, es una PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de ADN de factores de virulencia de ECEH, STEC, ECEP y EIEC/*Shigella* spp. en muestras de heces humanas no tratadas y en muestras de cultivo de personas con signos y síntomas de gastroenteritis aguda.

La prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC está pensada para apoyar el diagnóstico diferencial de las infecciones por *E. coli* (ECEH, ECEP, STEC y EIEC/*Shigella* spp.) en pacientes con síntomas de gastroenteritis junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por *E. coli* (ECEH, ECEP, STEC y EIEC/*Shigella* spp.) y no deben usarse como la única base para el diagnóstico.

El producto está destinado a un uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las enfermedades diarreicas son un importante problema de salud y causan aproximadamente 1700 millones de casos anuales en niños de todo el mundo⁽¹⁾. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), con aproximadamente 525 000 muertes al año, estas enfermedades son la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años, especialmente en los países en desarrollo⁽¹⁾. Uno de los patógenos bacterianos más comunes de las enfermedades diarreicas es *Escherichia coli*⁽²⁾.

E. coli es una bacteria móvil, gramnegativa y fermentadora de la lactosa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un habitante normal del tracto gastrointestinal, pero también puede causar enfermedades diarreicas con alta morbilidad y mortalidad en los niños, especialmente en los países en desarrollo. En función de las características de virulencia, la epidemiología y las manifestaciones clínicas de la bacteria, se identificaron las siguientes clases de *E. coli* diarreica: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* enteroagregante (EAEC). Todos estos patotipos diarreicos de *E. coli* pueden transmitirse por vía fecal-oral⁽³⁾.

Entre las *E. coli* patógenas intestinales, han cobrado especial importancia las *E. coli* enterohemorrágicas (ECEH). Son un subgrupo de las *E. coli* productoras de toxina Shiga o verotoxina (STEC y ECVT, respectivamente). La patogenicidad de las STEC se debe a su capacidad para colonizar el intestino adheriéndose a las células epiteliales intestinales. Tras la colonización, las bacterias son capaces de producir dos citotoxinas: las verotoxinas 1 y 2. Debido a la similitud entre las verotoxinas y las toxinas Shiga de *Shigella dysenteriae*, las ECVT también se denominan STEC. Otros factores importantes de patogenicidad de la ECEH para el diagnóstico son, además de *stx1/stx2* (genes de la toxina Shiga), los genes *eae* (gen de fijación y borrado de *E. coli*), que codifican la intimina, la proteína de la membrana. Esta

proteína de la membrana es responsable de la adhesión del patógeno a las células epiteliales intestinales⁽⁴⁾. Los síntomas clínicos que pueden causar las ECEH/STEC en los seres humanos van desde la diarrea sanguinolenta hasta el síndrome urémico hemolítico (SUH)^(2, 5). Las fuentes de infección son principalmente los alimentos contaminados, mientras que menos de 1000 bacterias son suficientes para causar una infección por ECEH/STEC. El peor brote relacionado con los alimentos causado por STEC en Alemania hasta ahora fue en 2011. Este brote causó 3816 infecciones por STEC identificadas y 54 muertes, de las cuales 32 estaban asociadas al SUH⁽⁵⁾. Las *E. coli* enteropatógenas (ECEP) son conocidas como causa de enfermedades diarreicas pediátricas, especialmente en los países en desarrollo⁽³⁾. La ECEP puede distinguirse de la ECEH por la ausencia de toxinas Shiga⁽³⁾. Los síntomas más comunes asociados a una infección por ECEP son diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre, mientras que la dosis infecciosa en adultos sanos es de unos 10⁸ organismos⁽⁵⁾.

La *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y la *Shigella* spp. también causan enfermedades diarreicas en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo. Ambas son bacterias gramnegativas que están bioquímicamente y genéticamente relacionadas entre sí⁽⁶⁾. La patogenicidad de la EIEC y la *Shigella* spp. se basa en la invasión mediada por plásmidos de las células epiteliales intestinales y su destrucción. Los productos del gen del antígeno H del plásmido de invasión (*ipaH*) son los responsables de este proceso. Este gen es relevante para la detección de EIEC/*Shigella* spp., y hace posible distinguir este patotipo de la ECEH. Se considera que los brotes de infecciones por EIEC/*Shigella* spp. son causados principalmente por alimentos y se manifiestan con diarrea, dolor abdominal, náuseas y fiebre⁽⁶⁾.

3. Principio del ensayo

RIDA®UNITY EHEC/EPEC es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de los genes para los factores de virulencia de EHEC, STEC, EPEC, EIEC/*Shigella* spp. en muestras y cultivos de heces humanas.

El procesamiento está totalmente automatizado con el sistema RIDA®UNITY. En primer lugar, se extraen los ácidos nucleicos utilizando el RIDA®UNITY Universal Extraction Kit y el Internal Control Kit.

La secuencia diana se detecta siempre en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso (incluso con los ensayos de ADN), donde la transcripción inversa (RT) y la posterior PCR se realizan en un vial de reacción. Durante el proceso, el ARN aislado (si está presente) se transcribe a ADNc mediante transcriptasa inversa. A continuación, se amplifican los fragmentos de genes específicos de los factores de virulencia *stx1/stx2*, *eae* e *ipaH* mediante PCR en tiempo real.

Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la Taq polimerasa separa al indicador del 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 con la cantidad de amplicones formados. El RIDA®UNITY Internal Control Kit debe utilizarse al mismo tiempo para poder comprobar la preparación de las muestras o la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.*

Tabla 1: Reactivos suministrados

REF	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 x	1935 µL	amarillo, listo para usar
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 x	350 µL	rojo, listo para usar
UNZ2205PC	Positive Control	1 x	200 µL	azul, listo para usar
UNZ2205NC	Negative Control	1 x	450 µL	blanco, listo para usar

* Con el uso repetido y en series más pequeñas, el número de reacciones puede reducirse.

5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación de la tabla 2 y almacene el kit directamente después de su uso, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a una temperatura de entre -16 °C y -28 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. La garantía de calidad deja de ser válida después de la fecha de caducidad.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- La congelación y descongelación repetida hasta 8 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de conservación	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-16 °C a -28 °C	Puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada.
abierto	-16 °C a -28 °C	8 ciclos de congelación y descongelación

6. Reactivos necesarios no suministrados

La prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR está pensada exclusivamente para su uso con el sistema RIDA®UNITY. Los siguientes productos son absolutamente necesarios para un uso correcto del kit:

6.1 Reactivos

Los siguientes reactivos son necesarios para realizar la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC:

Reactivos	Número de artículo
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo es necesario para realizar la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC:

Equipo
Sistema RIDA®UNITY; número de artículo: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Consumibles RIDA®UNITY (puntas, placas, viales de reacción, películas). Consulte las instrucciones de uso del sistema RIDA®UNITY, información sobre pedidos de consumibles.
Mezclador vórtex
Centrífuga de sobremesa
Guantes desechables sin talco
Termociclador externo (posible mejora del sistema)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

El kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC puede utilizarse junto con otros termocicladores compatibles. El usuario debe verificar/validar los equipos alternativos de PCR en tiempo real. Póngase en contacto con R-Biopharm AG en pcr@r-biopharm.de para comprobar la compatibilidad.

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Para el uso diagnóstico *in vitro*.

Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio cualificado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre estrictamente el manual de instrucciones al realizar este ensayo.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microbios y nucleasas (DNasa/RNasa).

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

No intercambie ni mezcle los componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) de un lote de un kit con los componentes de otro lote.

El kit de ensayo puede utilizarse durante 8 semanas después de su primera apertura (el kit puede recargarse hasta 6 veces). No utilice el kit de ensayo después de la fecha de caducidad. Estas especificaciones también son comprobadas por el sistema RIDA®UNITY.

Los usuarios son responsables de desechar de manera correcta todos los reactivos y materiales una vez utilizados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Encontrará más detalles sobre la hoja de datos de seguridad (Safety Data Sheet, SDS) con el número de artículo en <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para los usuarios de la Unión Europea: notificar todos los efectos adversos graves asociados al producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

El resumen de seguridad y funcionamiento (SSP) de este producto estará disponible en <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> una vez que se ponga en marcha la Base de Datos Europea de Productos Sanitarios (EUDAMED). En la base de datos, busque el dispositivo utilizando el UDI-DI situado en el embalaje exterior del equipo.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Se recomienda utilizar material de muestra fresco para lograr el mejor rendimiento posible del ensayo RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC.

Evite congelar y descongelar repetidamente la muestra.

No recoja las muestras de heces en recipientes de transporte que contengan medios con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes, porque estas sustancias pueden interferir con las pruebas RIDA[®]UNITY.

Se recomienda preparar alícuotas de las muestras para evitar la descongelación y congelación repetidas. Las muestras congeladas deben descongelarse inmediatamente antes de la extracción para evitar la degradación de los ácidos nucleicos.

Siga las instrucciones de almacenamiento de muestras de las tablas 3 y 6.

Tabla 3: Almacenamiento de muestras: detección de ECEH

Muestras nativas, heces		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 días	≤ 7 días	≤ 6 meses

Muestras nativas, cultivo		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 día	≤ 1 día	-

En el eluido (de las heces o del cultivo)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C / -80 °C, la congelación/descongelación repetida de la muestra de heces hasta 5 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C, la congelación/descongelación repetida del eluido (de heces o cultivo) hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

No realice cultivos a partir de heces previamente congeladas, ya que la congelación afecta gravemente a las características de crecimiento de los patógenos y esto puede provocar resultados falsos negativos.

Tabla 4: Almacenamiento de muestras: detección de STEC

Muestras nativas, heces		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 días	≤ 7 días	≤ 6 meses

Muestras nativas, cultivo		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 día	≤ 1 día	-

En el eluido (de las heces o del cultivo)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C / -80 °C, la congelación/descongelación repetida de la muestra de heces hasta 5 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C, la congelación/descongelación repetida del eluido (de heces o cultivo) hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

No realice cultivos a partir de heces previamente congeladas, ya que la congelación afecta gravemente a las características de crecimiento de los patógenos y esto puede provocar resultados falsos negativos.

Tabla 5: Almacenamiento de muestras: detección de ECEP

Muestras nativas, heces		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 días	≤ 7 días	≤ 6 meses

Muestras nativas, cultivo		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 día	≤ 1 día	-

En el eluido (de las heces o del cultivo)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C / -80 °C, la congelación/descongelación repetida de la muestra de heces hasta 5 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C, la congelación/descongelación repetida del eluido (de heces o cultivo) hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

No realice cultivos a partir de heces previamente congeladas, ya que la congelación afecta gravemente a las características de crecimiento de los patógenos y esto puede provocar resultados falsos negativos.

Tabla 6: Almacenamiento de muestras: detección de EIEC/*Shigella* spp.

Muestras nativas, heces		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 día	≤ 7 días	≤ 6 meses

Muestra nativa, cultivo		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 1 día	-

En el eluido (de las heces o del cultivo)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C / -80 °C, la congelación/descongelación repetida de la muestra de heces hasta 5 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C, la congelación/descongelación repetida del eluido (de heces o cultivo) hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

No realice cultivos a partir de heces previamente congeladas, ya que la congelación afecta gravemente a las características de crecimiento de los patógenos y esto puede provocar resultados falsos negativos.

8.1 Preparación del ADN a partir de muestras de heces y cultivo

Para aislar el ADN de las muestras de heces y cultivo, utilice el RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Siga los procedimientos correctos en las instrucciones de uso del RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (Sección: Preparación de ácido nucleico a partir de muestras de heces; Sección: Preparación de ácido nucleico a partir de muestras de heces).

9. Ejecución de la prueba

Coloque tanto las muestras como los reactivos del RIDA®UNITY EHEC/EPEC en el sistema RIDA®UNITY al inicio de su uso.

Previamente, mezcle de manera apropiada la **Reaction Mix**, el **Negative Control** y el **Positive Control** utilizando un mezclador vórtex. No agite en un mezclador vórtex la **Enzyme Mix**. Después, centrifugue brevemente todos los componentes.

Los tubos de PCR para las muestras a examinar deben colocarse previamente en el termociclador de PCR integrado.

Existen soportes para cargar correctamente el sistema con reactivos y consumibles. Para el proceso de carga, siga las instrucciones del sistema RIDA®UNITY. Observe las secciones correspondientes del manual del sistema RIDA®UNITY (Sección: Realización de un análisis).

La prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC solo puede utilizarse en combinación con el RIDA®UNITY Internal Control Kit. Esto permite el reconocimiento temprano de la inhibición potencial de la PCR, la verificación de la integridad de los reactivos y la confirmación de la extracción exitosa de ácidos nucleicos. El procedimiento se describe en las instrucciones de uso del RIDA®UNITY Internal Control Kit (Sección: Realización de la prueba).

El procesamiento automatizado se describe en el manual del sistema RIDA®UNITY (Sección: Realización de un análisis).

9.1 Configuración del dispositivo

9.1.1 Perfil universal por PCR en tiempo real

Para armonizar los ensayos RIDA®UNITY, el ensayo RIDA®UNITY EHEC/EPEC se verificó exclusivamente en el perfil universal. Esto permite combinar los ensayos de ADN y ARN entre sí. En términos generales, la transcripción inversa es lo primero en el perfil universal.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real para el RIDA®UNITY

<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	Tiempo de almacenamiento

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el CFX96™ Dx

<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	Tiempo de almacenamiento

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

9.2 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
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>stx1/stx2</i>	FAM	Canal SEEK stx
	Control interno	HEX	Canal SEEK ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	Canal SEEK ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	Canal SEEK eae
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>stx1/stx2</i>	FAM	Canal SEEK stx
	Control interno	VIC	Canal SEEK ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	Canal SEEK ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	Canal SEEK eae

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

Las muestras se evalúan con el software analítico RIDA®SEEK del sistema RIDA®UNITY. El **Negative Control** y el **Positive Control** deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 9).

El **Positive Control** está presente en una concentración de 10^3 copias/ μ L. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 copias en cada corrida de PCR.

El **Negative Control** ya contiene el control interno RIDA®UNITY. Como los controles no contienen una plantilla, no hay que prever ninguna señal en los canales de destino. Las señales positivas en el canal IC con el que se detecta el control interno son esenciales (consulte la tabla 10).

Tab.10: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	IC Ct	Ct de genes diana
Control positivo	+	N/A*	Ver el Certificate of Analysis
Control negativo	-	Ct > 20	0

*En determinadas circunstancias, el canal IC puede tener una señal positiva en el control positivo y, por tanto, no debe evaluarse.

Si el control positivo no se detecta en el intervalo de Ct especificado pero el control negativo es válido, es necesario volver a analizar en la PCR todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, es necesario volver a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

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

Si las condiciones tampoco se cumplen después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

La evaluación y la interpretación de las muestras se realizan mediante el software analítico del sistema RIDA®UNITY, RIDA®SEEK.

Actualmente no existe ningún método de referencia o material de referencia reconocido internacionalmente para la normalización. Los materiales de control son metrologicamente trazables a los estándares internos de R-Biopharm AG basados en amplicones específicos de ADN.

Para obtener más información sobre la trazabilidad metroológica, póngase en contacto con R-Biopharm AG.

Los valores especificados, los rangos y otros detalles se encuentran en el certificado de análisis (Certificate of Analysis, CoA).

Tabla 11: Interpretación de los resultados*

Detección de			IC	Resultado
<i>stx1/stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>		
+	-	-	+/-	STEC (ECEH) detectable
-	+	-	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detectable
-	-	+	+/-	ECEP detectable
+	+	-	+/-	STEC (ECEH) y EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detectables
+	-	+	+/-	ECEH detectable
-	+	+	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. y ECEP detectables
+	+	+	+/-	ECEH y EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detectables
-	-	-	+	Genes diana no detectables
-	-	-	-	No válido

* += positivo
- = negativo

La Ley de protección contra infecciones (IfSG) describe la ECEH como la *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), que es un patógeno humano. Dado que por el momento no se puede establecer una definición exacta de las STEC patógenas para el ser humano, **toda** STEC se considera una ECEH potencial⁽⁵⁾.

Una muestra es positiva si el ADN de la muestra y el Internal Control presentan señal de amplificación en el sistema de detección.

Una muestra también es positiva si el ADN de la muestra presenta señal de amplificación pero no se observa ninguna señal de amplificación para el **Internal Control** en el sistema de detección. La detección del **Internal Control** no es necesaria en este caso debido a que las concentraciones altas de amplicón pueden dar lugar a una señal débil o ausente del **Internal Control**.

Una muestra es negativa si el ADN de la muestra no presenta señal de amplificación pero se observa una señal de amplificación para el **Internal Control** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR y la extracción previa se pueden excluir por la detección del **Internal Control**.

Una muestra no es válida si el ADN de la muestra y el **Internal Control** no muestran una señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción.

12. Limitaciones del método

1. La prueba RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC detecta el ADN de los factores de virulencia de ECEH, STEC, ECEP y EIEC/Shigella spp. en muestras de heces y cultivos humanos no tratados. Este ensayo no permite derivar una conexión entre el valor Ct determinado y la ocurrencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con los síntomas clínicos completos.
2. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre deben tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
3. Esta prueba está aprobada únicamente para el procesamiento automático mediante el sistema RIDA[®]UNITY.
4. Este ensayo solo está verificado para muestras de heces y cultivo.
5. Cuando se utilice la matriz de cultivo, no se debe transferir el medio de agar a la reacción de PCR, ya que esto puede provocar posibles interferencias.
6. La obtención, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento incorrectos de las muestras, o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica de la prueba, pueden dar lugar a resultados falsos negativos.
7. La presencia de inhibidores de PCR puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos.
8. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse una concentración sumamente baja de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LoD 95 %). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
9. Las mutaciones o polimorfismos en los sitios de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas, y pueden dar lugar a resultados falsos negativos con RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC.
10. Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que los genes objetivo (ECEH, *stx1/2*, *eae*; STEC, *stx1/2*; ECEP, *eae*; y EIEC/Shigella spp., *ipaH*) están presentes.
11. Este ensayo debe realizarse de conformidad con la normativa de las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los usuarios deben seguir atentamente las instrucciones del fabricante al realizar la prueba.

13. Características de rendimiento

13.1 Características de rendimiento clínico

La prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR se comparó en un laboratorio externo con una prueba de referencia con marca CE basada en 276 muestras de heces de pacientes con síntomas de infección gastrointestinal.

Los resultados muestran una sensibilidad y especificidad muy altas en la detección de factores de virulencia de ECEH, STEC, ECEP y EIEC/*Shigella* spp. con el uso del kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC.

Tabla 12: Detección de *stx1/2*, muestras de heces

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>stx1/2</i>	Positivo	122	0	122
	Negativo	5	149	154
	Total	127	149	276

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	96,1 % (91,1 % - 98,7 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	100 % (97,6 % - 100 %)

Tabla 13: Detección de *ipaH*, muestras de heces

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>ipaH</i>	Positivo	65	0	65
	Negativo	0	211	211
	Total	65	211	276

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	100 % (94,5 % - 100 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	100 % (98,3 % - 100 %)

Tabla 14: Detección de *eae*, muestras de heces

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>eae</i>	Positivo	179	0	179
	Negativo	4	93	97
	Total	183	93	276

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	97,8 % (94,5 % - 100 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	100 % (96,1 % - 100 %)

13.2 Características de rendimiento analíticas

13.2.1 Límite de detección (LoD 95 %)

Se midió una muestra de control positivo (muestras de heces negativas, enriquecidas o usando una muestra de cultivo) en cinco pasos de dilución (en pasos de 0,25 log) para cada objetivo con 20 réplicas por paso en un lote para determinar el LoD. A continuación, se realizó un análisis probit. A continuación, se confirmó el LoD calculado con 20 réplicas por objetivo para el paso de dilución/concentración calculado.

Se utilizaron las siguientes cepas para las pruebas:

- *stx1/stx2*: *Escherichia coli* D3509 (Se determinó el LoD para *stx2* porque este está asociado al síndrome urémico hemolítico)
- *ipaH*: *Escherichia coli* (Fr1368)
- *eae*: *Escherichia coli* (DSM8695)

Para la detección del ADN de ECEH, STEC, ECEP y EIEC/*Shigella* spp. utilizando el ensayo RIDA®UNITY EHEC/EPEC en el sistema UNITY, se determinaron los siguientes límites de detección (LoD).

Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 15.

Tabla 15: Resultados del límite de detección de la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC para las dianas *stx1/2*, *ipaH* y *eae*.

	Matriz	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Heces	476 000 CFU/mL	5300 CFU/mL	125000 CFU/mL
	Cultivo	2130 CFU/mL	798 CFU/mL	2890 CFU/mL

*CFU: Unidades formadoras de colonias (Colony Forming Units)

El LoD para el parámetro *stx1/2* en las muestras de heces se determinó en 476 000 CFU/mL.

El LoD para *ipaH* en las muestras de heces se determinó en 5300 CFU/mL.

El LoD para *eae* en las muestras de heces se determinó en 125 000 CFU/mL.

El LoD para *stx1/2* en muestras de cultivo se determinó en 2130 CFU/mL.

El LoD para *ipaH* en las muestras de cultivos se determinó en 798 CFU/mL.

El LoD para *eae* en las muestras de cultivo se determinó en 2890 CFU/mL.

Para el flujo de trabajo mejorado utilizando el CFX96™ Dx, estos valores de LoD se confirmaron bajo el supuesto de que nos mantenemos en un rango de LoD de 2-3 veces.

13.2.2 Especificidad analítica

Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. Por lo tanto, se investigaron los efectos de diversas sustancias que pueden existir dado su uso generalizado para las infecciones gastrointestinales o la ocurrencia generalizada en las muestras correspondientes.

Las sustancias que podrían influir significativamente en los resultados de las pruebas se examinaron inicialmente a altas concentraciones (el triple de la dosis diaria o la simulación del peor caso) en un cribado de interferencia.

No se identificó interferencia para las sustancias enumeradas en la tabla 16.

Tabla 16: Sustancias potencialmente interferentes

Sustancia potencialmente interferente	Concentración
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg tabletas recubiertas con película (azitromicina)	0,75 % [p/v]
Sulfato de bario	18,5 % [v/v]
Edulcorante líquido Cologran® (sacarina + ciclamato)	1,3 % [p/v]
Sangre humana	5 % [v/v]
Tabletas de carbón vegetal 250 mg (carbón vegetal)	6 % [p/v]
Loperamide-ratiopharm® agudo (loperamida)	0,02 % [v/v]
Mucinas	5 % [p/v]
Ácido esteárico/palmítico	40 % [p/v]

Reacciones cruzadas

Se investigaron diversos organismos (bacterias, parásitos, hongos y virus) que pueden encontrarse en la matriz de las heces. Los microorganismos a investigar para este ensayo se eligieron porque, o bien están presentes de forma natural en las muestras de heces, o bien causan los síntomas correspondientes como patógenos gastrointestinales. Para los análisis se utilizaron cultivos bacterianos (entre 10^6 y 10^9 CFU/mL) o cultivos fúngicos o virales, sobrenadantes de cultivos virales, aislados y estándares de LGC de los microorganismos en cuestión.

La prueba RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR es específica para ECEH, STEC, ECEP y EIEC/*Shigella* spp. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 17):

Tabla 17: Microorganismos con posible reactividad cruzada.

Microorganismo	Resultados de la prueba*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adenovirus 40	-	-	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
Astrovirus 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-	-

<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** Portland 1	-	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** WB Clon C6	-	-	-
<i>Giardia lamblia</i> **	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GI	-	-	-
Norovirus GII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (serotipo Enteritidis)	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (serotipo Typhimurium)	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-

* - = negativo

** *Giardia intestinalis* y *Giardia lamblia* son el mismo organismo.

13.2.3 Precisión

Se determinó la precisión de la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR para los siguientes niveles de consideración.

Precisión intraensayo: determinación de 5 muestras de control con 20 réplicas cada una en el RIDA®UNITY en condiciones idénticas.

Precisión interensayo: determinación de 5 muestras de control en 20 corridas por duplicado en 10 días de trabajo (2 corridas por día) realizadas por técnicos diferentes en condiciones reproducibles.

las pruebas de precisión intra e interensayo se llevaron a cabo con tres lotes diferentes.

Los coeficientes de variación obtenidos para cada medición utilizando la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR en el RIDA®UNITY y el CFX96™ Dx fueron del 4,29 %.

Tabla 18: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC para *stx1/2* a partir de muestras de heces (sistema RIDA®UNITY).

Ct	Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	27,8	27,7	27,4	27,8	27,7	27,6	27,7
	CV (%)	1,02 %	1,19 %	1,11 %	3,25 %	3,19 %	3,18 %	3,21 %
2	Ct	29,6	29,5	29,2	30,0	29,8	29,8	29,8
	CV (%)	1,07 %	0,87 %	0,85 %	2,93 %	2,66 %	2,53 %	2,71 %
3	Ct	29,2	29,0	28,9	30,2	30,0	30,1	30,1
	CV (%)	1,72 %	1,35 %	1,46 %	3,29 %	2,85 %	3,15 %	3,10 %
4	Ct	-	-	-	32,0	31,7	31,6	31,8
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	2,15 %	2,23 %	2,26 %	2,28 %
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	CV (%)	2,34 %	2,05 %	2,13	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabla 19: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC para *stx1/2* a partir de muestras de heces (CFX96™ Dx).

Ct	Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	27,2	27,1	26,9	26,1	26,0	26,0	26,0
	CV (%)	0,82 %	1,04 %	0,76 %	3,12 %	2,61 %	2,64 %	2,80 %
2	Ct	27,6	27,2	27,1	28,1	27,5	27,5	27,7
	CV (%)	1,91 %	0,95 %	0,71 %	4,03 %	3,02 %	2,86 %	3,50 %
3	Ct	27,7	27,2	27,2	28,1	27,7	27,6	27,8
	CV (%)	2,34 %	0,74 %	0,95 %	4,29 %	3,11 %	2,91 %	3,54 %
4	Ct	-	-	-	29,2	28,7	28,6	28,9
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	2,96 %	2,90 %	2,76 %	3,04 %
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	CV (%)	1,52 %	1,59 %	3,43 %	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabla 20: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC para *ipaH* a partir de muestras de heces (sistema RIDA®UNITY).

Ct	Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	25,0	24,8	24,6	25,3	25,1	25,1	25,2
	CV (%)	1,02 %	1,11 %	1,09 %	1,84 %	1,73 %	1,83	1,80 %
2	Ct	26,2	26,1	26,0	26,3	26,1	26,2	26,2
	CV (%)	0,81 %	0,89 %	0,90 %	1,49 %	1,39 %	1,37 %	1,40 %
3	Ct	25,5	25,3	25,4	26,2	26,1	26,1	26,1
	CV (%)	0,96 %	0,99 %	0,87 %	1,72 %	1,57 %	1,53 %	1,61 %
4	Ct	-	-	-	27,1	27,0	27,0	27,0
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	1,44 %	1,34 %	1,45 %	1,42 %
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	CV (%)	0,88 %	0,77 %	0,69 %	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabla 21: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC para *ipaH* a partir de muestras de heces (CFX96™ Dx).

Ct	Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	25,1	25,0	24,8	24,4	24,4	24,4	24,4
	CV (%)	1,15 %	1,25 %	1,06 %	1,49 %	1,79 %	1,70 %	1,67 %
2	Ct	25,2	25,2	25,2	25,4	25,3	25,4	25,4
	CV (%)	0,85 %	1,03 %	1,01 %	1,11 %	1,21 %	1,21 %	1,17 %
3	Ct	25,2	25,0	25,0	25,4	25,4	25,3	25,4
	CV (%)	1,04 %	1,09 %	1,14 %	1,29 %	1,46 %	1,53 %	1,43 %
4	Ct	-	-	-	26,2	26,1	26,1	26,2
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	1,27 %	1,45 %	1,36 %	1,36 %
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	CV (%)	0,89 %	0,53 %	0,70 %	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabla 22: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC para eae a partir de muestras de heces (sistema RIDA®UNITY).

Ct	Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	26,2	26,3	26,0	26,4	26,5	26,5	26,5
	CV (%)	0,93 %	0,86 %	0,85 %	1,92 %	1,95 %	2,03 %	1,97 %
2	Ct	27,7	27,9	27,7	27,9	28,0	28,0	27,9
	CV (%)	0,86 %	0,92 %	0,77 %	1,85 %	1,76 %	1,75 %	1,78 %
3	Ct	27,0	27,0	27,2	27,8	27,9	27,9	27,9
	CV (%)	1,05 %	0,86 %	0,99 %	2,03 %	1,84 %	1,80 %	1,89 %
4	Ct	-	-	-	28,9	29,1	29,1	29,0
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	1,81 %	1,78 %	1,81 %	1,80 %
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	CV (%)	1,24 %	0,78 %	1,18 %	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabla 23: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC para eae a partir de muestras de heces (CFX96™ Dx).

Ct	Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	26,5	26,6	26,5	26,3	26,4	26,4	26,4
	CV (%)	0,54 %	0,69 %	0,58 %	1,76 %	1,86 %	1,88 %	1,84 %
2	Ct	27,3	27,5	27,5	27,6	27,7	27,8	27,7
	CV (%)	0,68 %	0,68 %	0,65 %	1,49 %	1,70 %	1,51 %	1,59 %
3	Ct	27,3	27,4	27,4	27,6	27,8	27,8	27,7
	CV (%)	0,88 %	0,74 %	0,79 %	1,66 %	1,78 %	1,85 %	1,77 %
4	Ct	-	-	-	28,5	28,7	28,6	28,6
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	1,32 %	1,58 %	1,48 %	1,47 %
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	CV (%)	0,73 %	0,55 %	0,68 %	N/A	N/A	N/A	N/A

13.2.4 Reactividad analítica

La reactividad de la prueba RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR se probó en un panel definido de cepas de *E. coli* y *Shigella* (consulte la tabla 24).

Tabla 24: Pruebas de reactividad analítica

Cepa	Resultado*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>E. coli (stx1c, stx2b)</i>	+	-	-
<i>E. coli (stx1a, stx2c, eae)</i>	+	-	+
<i>E. coli (stx1d)</i>	+	-	
<i>E. coli (stx2a, eae)</i>	+	-	+
<i>E. coli (stx2d)</i>	+	-	-
<i>E. coli (stx2e)</i>	+	-	-
<i>E. coli (stx2f, eae)</i>	+	-	+
<i>E. coli (stx2g)</i>	+	-	-
<i>E. coli</i> O127:H6 (<i>eae alpha</i>)	-	-	+
<i>E. coli</i> O157:H7 (<i>eae gamma</i>)	-	-	+
<i>Shigella boydii (ipaH)</i>	-	+	-
<i>Shigella dysenteriae (ipaH)</i>	-	+	-
<i>Shigella flexneri (ipaH)</i>	-	+	-
<i>Shigella sonnei (ipaH)</i>	-	+	-

*+ = positivo (al menos 2 de 3 réplicas positivas)

- = negativo

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y designación
2022-06-14	Versión de lanzamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Siga las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservación
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Mezcla de reacción
	Mezcla enzimática
	Control negativo
	Control positivo

16. Bibliografía

1. Aziz FAA, Ahmad NA, Razak MAA, Omar M, Kasim NM, Yusof M, et al. Prevalence of and factors associated with diarrhoeal diseases among children under five in Malaysia: a cross-sectional study 2016. *BMC Public Health*. 2018;18(1):1363.
2. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(12):6235-54.
3. Schuetz AN. Emerging agents of gastroenteritis: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*. *Semin Diagn Pathol*. 2019;36(3):187-92.
4. Newell DG, La Ragione RM. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transbound Emerg Dis*. 2018;65 Suppl 1:49-71.
5. Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang JY. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch Microbiol*. 2017;199(6):811-25.
6. Lagerqvist N, Löf E, Enkirch T, Nilsson P, Roth A, Jernberg C. Outbreak of gastroenteritis highlighting the diagnostic and epidemiological challenges of enteroinvasive *Escherichia coli*, County of Halland, Sweden, November 2017. *Euro Surveill*. 2020;25(9).