

RIDA® GENE EHEC/EPEC

REF PG2205



Deutsch	3
English.....	25
Español.....	47
Français.....	69
Italiano	91

RIDA[®] GENE EHEC/EPEC

REF PG2205

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA[®]GENE EHEC/EPEC ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung der Gene für die Virulenzfaktoren von EHEC, STEC, EPEC und EIEC/*Shigella* spp. in humanen Stuhl- und Kulturproben.^{1,2}

Die RIDA[®]GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch pathogene *Escherichia coli* bzw. *Shigella* spp. verursachte Gastroenteritis unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Escherichia coli (*E. coli*) sind gram-negative, durch peritriche Begeißelung bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien und gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. *E. coli* ist Bestandteil der normalen Darmflora des Menschen, aber auch vieler landwirtschaftlicher Nutztiere und ist in der Regel apathogen. Einige Stämme von *E. coli* sind durch den Erwerb von bestimmten Pathogenitätsfaktoren (z.B. Toxin-Gene) humanpathogen.

Die sechs bekannten darmpathogenen *E.coli* enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und diffus adhärente *E. coli* (DAEC) lassen sich durch die spezifischen Pathogenitätsfaktoren differenzieren.³

Eine besondere Bedeutung unter den darmpathogenen *E. coli* haben die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) erlangt. Jedes Jahr werden in Deutschland ca. 1000 EHEC-Erkrankungen gemeldet.

EHEC sind eine Untergruppe der Shigatoxin- bzw. Verotoxin-bildenden *E. coli* (STEC bzw. VTEC) und haben die Fähigkeit zur Bildung zweier Zytotoxine, Verotoxin 1 und 2. Wegen der Ähnlichkeit der Verotoxine zum Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* werden die VTEC synonym auch als STEC bezeichnet. Ein weiterer wichtiger diagnostischer EHEC-Pathogenitätsfaktor ist neben stx1/stx2 (Shigatoxin Gene) das eae-Gen (*E. coli* attaching and effacing Gen), welches Intimin codiert. Intimin befähigt den Erreger u.a. sich an die Darmepithelzellen anzuheften. Durch den Nachweis des ipaH-Gens (invasion plasmid antigen H Gen) können EHEC/STEC gegen Shigellen/EIEC abgegrenzt werden.

Die klinischen Symptome, die durch EHEC verursacht werden, reichen von leichten Durchfällen über schwere Gastroenteritiden bis hin zur hämorrhagischen Colitis, die in ca. 10 bis 20 % der Infektionen vorkommt. Als lebensbedrohliche postinfektiöse Komplikation kann es bei 5 - 10 % der Infektionen besonders bei Säuglingen und kleinen Kindern, aber auch bei alten oder immungeschwächten Patienten zur Ausbildung eines hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) oder einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) kommen. Die Letalität bei HUS und TTP ist besonders im Kindesalter hoch (ca. 10 - 15 %). Es kann akutes Nierenversagen mit vorübergehender Dialysepflicht, aber auch ein irreversibler Verlust der Nierenfunktion mit daraus resultierender ständiger Dialyse eintreten. Die Inkubationszeit liegt bei 2 bis 10 Tagen. Wegen seiner hohen Umweltresistenz liegt die Infektionsdosis für EHEC bei nur 100 Keimen. Infektionsquellen sind von Rindern, Schafen oder Ziegen gewonnene, kontaminierte Lebensmittel, insbesondere rohes oder nicht ausreichend erhitztes Fleisch oder Fleischprodukte und nicht pasteurisierte Roh- oder Vorzugsmilch sowie kontaminierte Obst und Gemüseprodukte. Aber auch Infektionsketten von Mensch zu Mensch, besonders in Gemeinschaftseinrichtungen wie Kindergärten, Altenheimen oder Krankenhäusern, sowie direkte Kontakte zu Tieren sind von Bedeutung.^{4,5} Enteropathogene *E. coli* (EPEC) verursachen vor allem bei (Klein-) Kindern Durchfallerkrankungen. Der EPEC Pathogenitätsfaktor ist ebenfalls das *eae*-Gen.⁴

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE EHEC/EPEC ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung der Gene für die Virulenzfaktoren von EHEC, STEC, EPEC und EIEC/*Shigella* spp. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente der Virulenzfaktoren *stx1/stx2*, *eae* und *ipaH* amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA[®]GENE EHEC/EPEC Test enthält eine **Internal Control DNA** (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 – 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 – 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA® GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab.2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und des LightCycler® 480 z
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-freies Wasser)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Präparation aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:3 mit Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 30 sec bei 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®]GENE EHEC/EPEC Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control DNA dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

8.2 DNA-Präparation aus Kulturproben

Für die DNA-Präparation aus Kulturproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Für die DNA-Präparation aus Kulturproben wird folgende Extraktionsmethode empfohlen: Für die Kulturproben 1 ml PCR-Wasser in ein Präparationsröhrchen vorlegen. Mit einer Impföse mehrere Kolonien sammeln und im vorgelegten PCR-Wasser suspendieren. Den Stab der Impföse abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen und 60 sec stark vortexen. Danach im Heizblock für 10 min bei 95°C unter Schütteln erhitzen. Anschließend 1 min bei 13.000 x g zentrifugieren und den Überstand als Probe einsetzen.

Hinweis: Bei starker Trübung den Zentrifugationsschritt ggf. wiederholen.

Der RIDA[®] GENE EHEC/EPEC Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-PCR-Wasser-Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab.3, Tab.4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
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
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR-Profil

Tab. 5: DNA real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: DNA real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500, CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR-Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 7: Universal real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 8: Universal real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500, CFX96™ und Rotor-Gene Q

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	stx1/stx2	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
	ipaH	533/610	
	eae	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	stx1/stx2	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	540/580	
	ipaH	540/610	
	eae	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	stx1/stx2	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
ABI 7500	stx1/stx2	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	stx1/stx2	FAM	-
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Qiagen Rotor-GENE Q	stx1/stx2	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werks-einstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	ipaH	Orange	
	eae	Red	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μl vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

**¹ Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

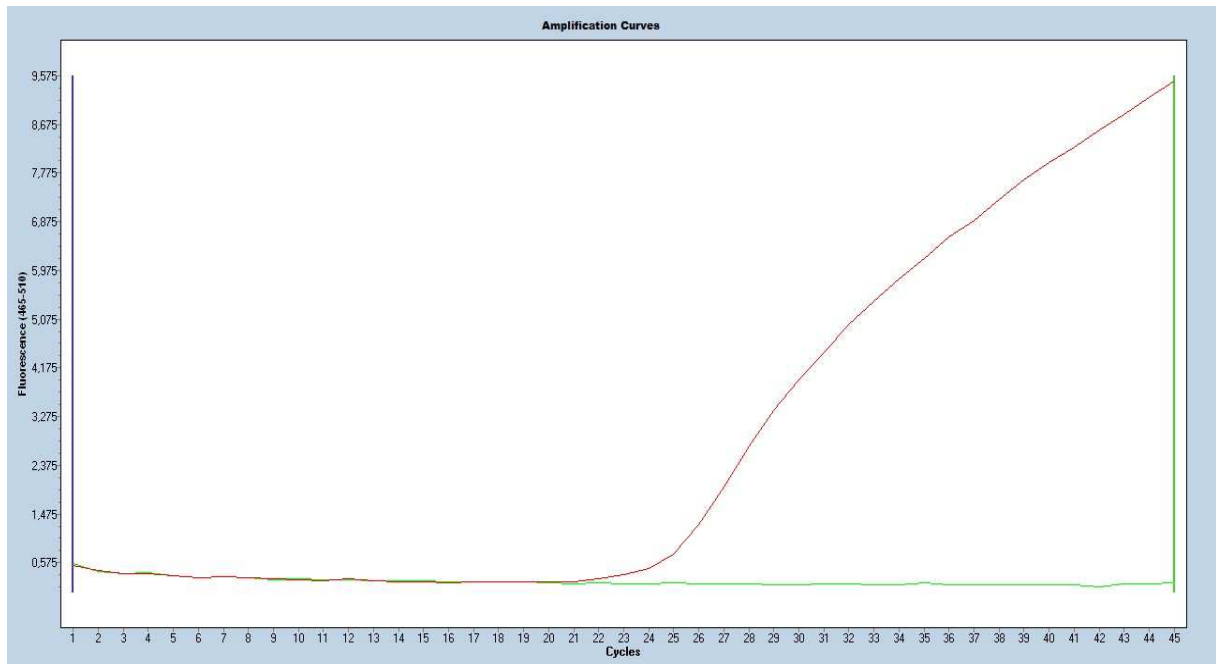


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (stx1/stx2) auf dem LightCycler® 480II

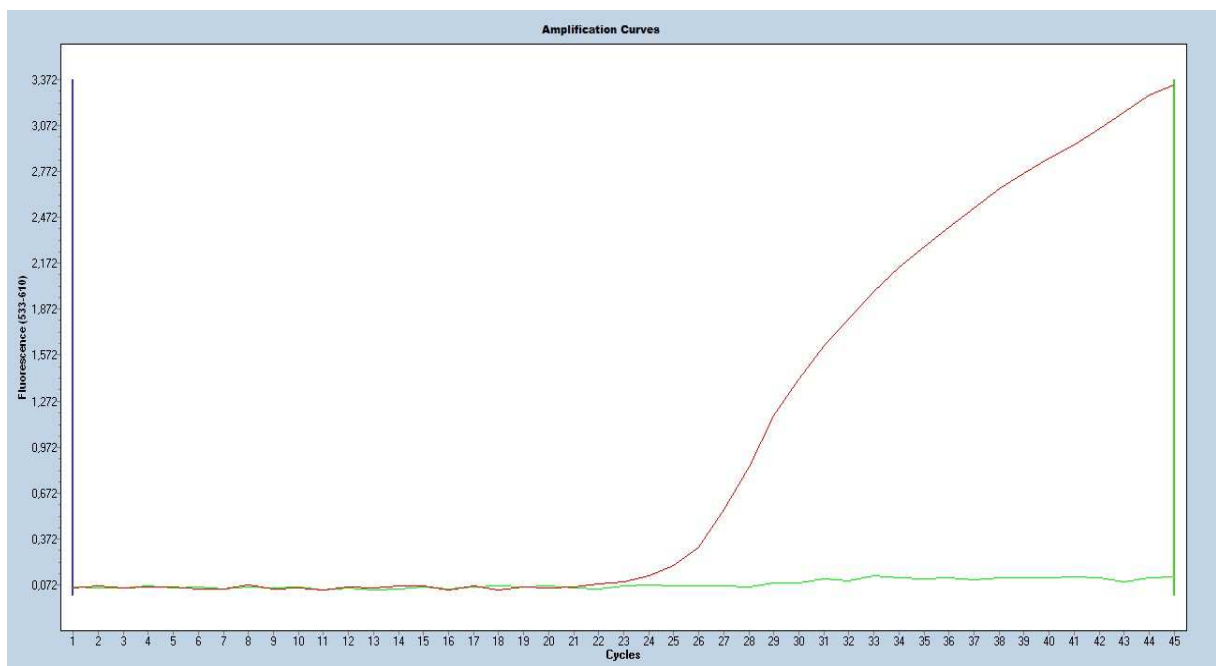


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (ipaH) auf dem LightCycler® 480II

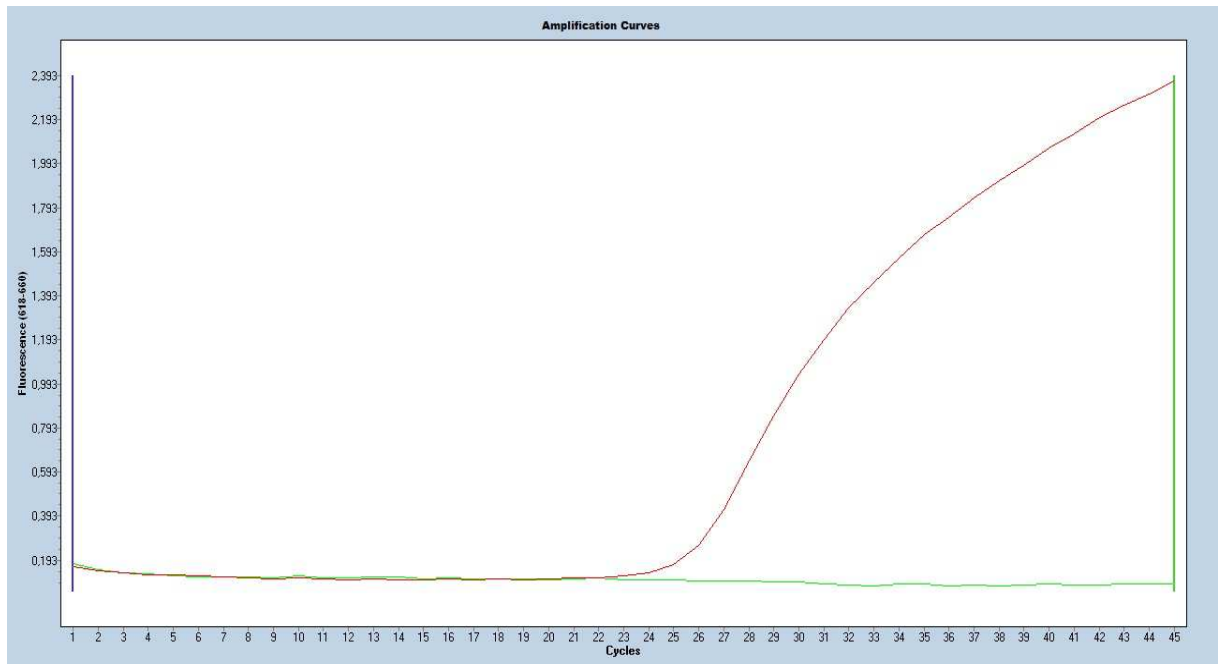


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (eae) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Interpretation der Ergebnisse

Pathogenitätsfaktor-Gene				
stx1/stx2	ipaH	eae	ICD	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	STEC (EHEC) nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	EPEC nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	STEC (EHEC) und EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	EHEC nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. und EPEC nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	EHEC und EIEC/ <i>Shigella</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Im Infektionsschutzgesetz (IfSG) werden unter dem Begriff EHEC diejenigen STEC (Shigatoxin-produzierende *E.coli*) verstanden, die humanpathogen sind. Da eine genaue Definition humanpathogener STEC gegenwärtig nicht möglich ist, wird **jeder** STEC als potentieller EHEC angesehen.⁵

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Probe keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige Internal Control DNA positiv ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion bzw. ein Fehler im Extraktionsverfahren kann durch die Detektion der Internal Control DNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Probe eine Amplifikation im Nachweissystem und in der dazugehörigen Internal Control DNA zeigt.

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Probe eine Amplifikation im Nachweissystem, jedoch keine für die Internal Control DNA zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA führen können.

Eine Probe ist nicht auswertbar, wenn die Probe und die Internal Control DNA im Nachweissystem keine Amplifikation zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhl- und Kulturproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®]GENE EHEC/EPEC zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden in-vitro-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (stx1/stx2, ipaH, eae) vorhanden sind.
8. **Mucin kann bereits in geringen Mengen interferierende Eigenschaften aufweisen.**

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®] GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien/Reaktion für stx1/stx2, ipaH und eae.

Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen Verdünnungsreihen von stx1/stx2, ipaH und eae (jeweils $10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II.

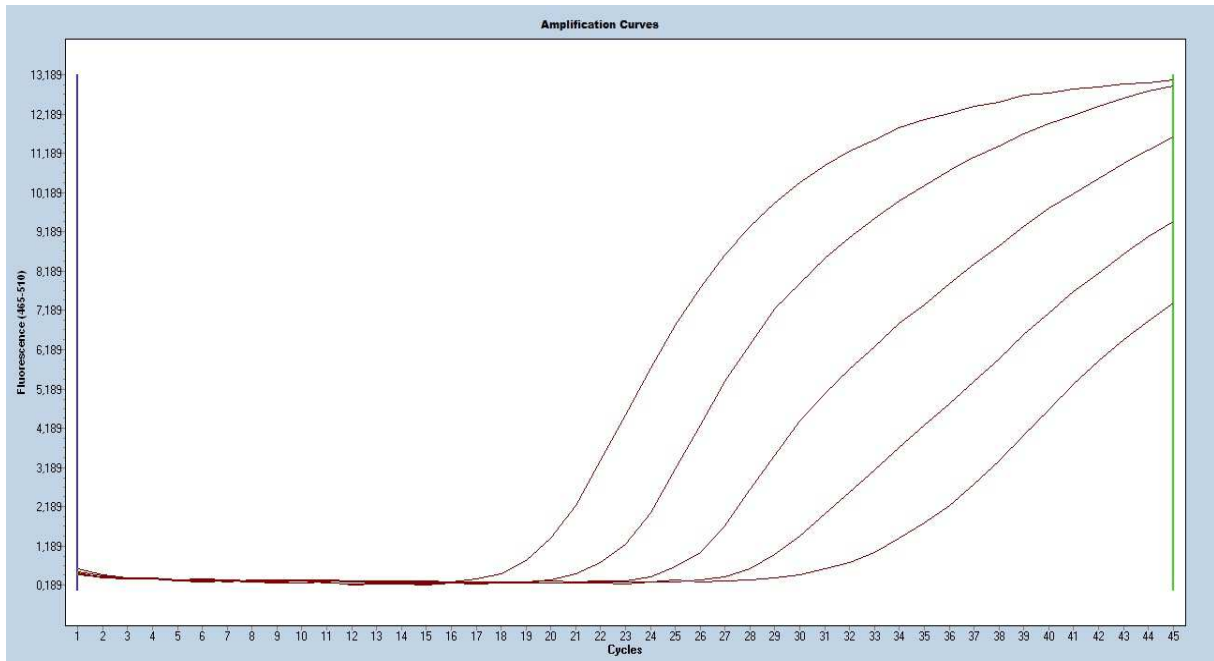


Abb. 4: Verdünnungsreihe Shigatoxin-Gene stx1/stx2 ($10^5 - 10^1$ DNA-Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

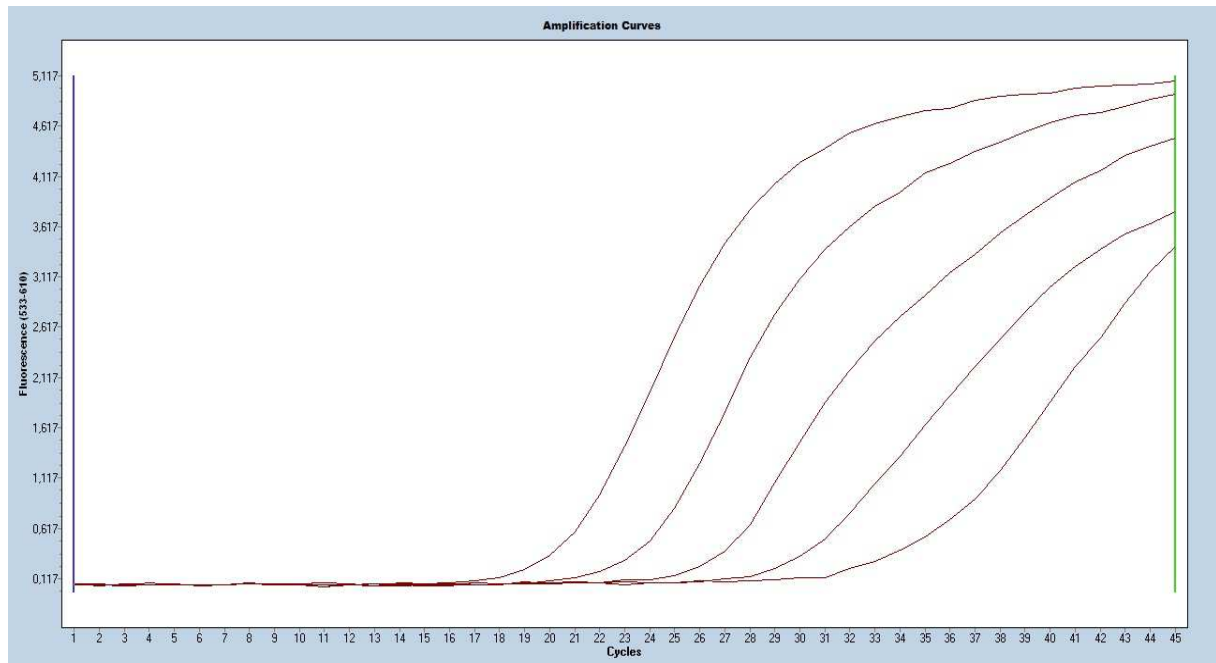


Abb. 5: Verdünnungsreihe ipaH-Gen ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler[®] 480II

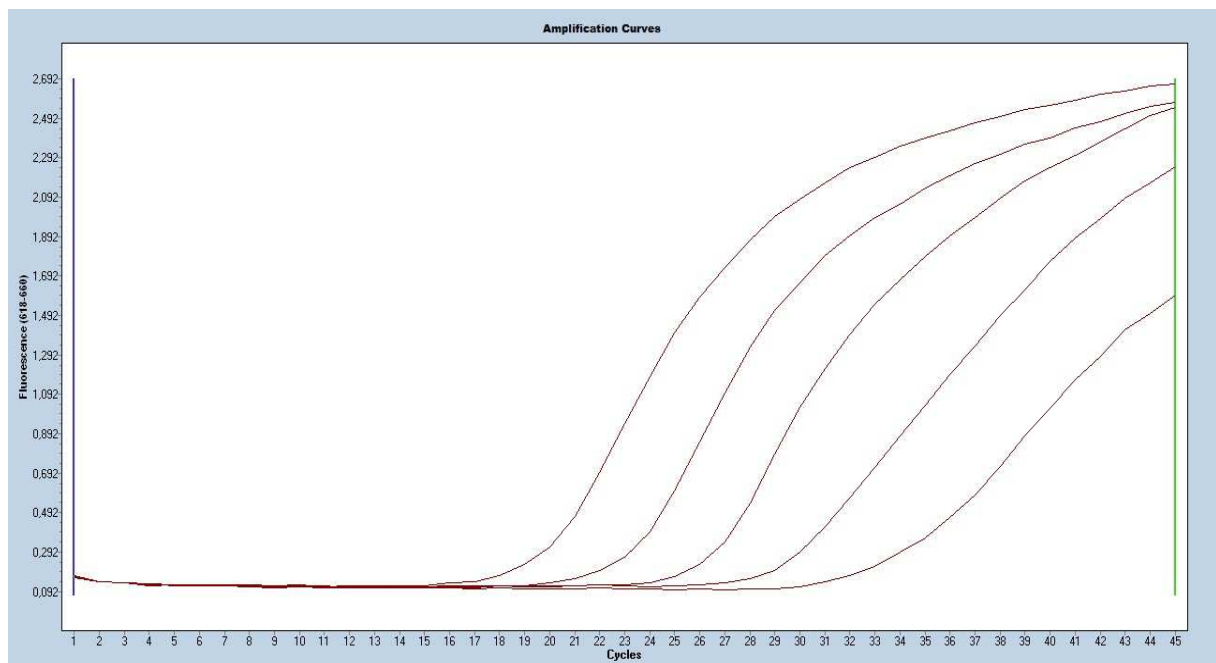


Abb. 6: Verdünnungsreihe eae-Gen ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler[®] 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, DNA-Extraktion und dem DNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR ist spezifisch für stx1/stx2, ipaH und eae. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

Tab. 12: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus GI	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GII	-
Astrovirus 2	-	<i>Clostridium sordelli</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland1	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium bifermentas</i>	-				

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA[®]GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen stx1- und stx2-Subtypen sowie eae- und ipaH-Subtypen untersucht (s. Tab. 13). Folgende Untereinheiten wurden mit der RIDA[®]GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR nachgewiesen:

Tab.13: Analytische Reaktivitätstestung










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

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2014-08-14	Freigabeversion
2018-08-24	Generelle Überarbeitung
2018-08-24	4. Packungsinhalt 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 11. Interpretation der Ergebnisse 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. Müller D, *et al.* Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73 (10): 3380–3390.
2. Thiem VD, *et al.* Detection of Shigella by a PCR Assay Targeting the ipaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
3. Kaper JM, *et al.* PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:123-140.
4. Nataro JP and Kaper JM. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(1): 132-201.
5. Robert Koch Institut. Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). RKI-Ratgeber für Ärzte 2008.

RIDA[®] GENE EHEC/EPEC

REF PG2205

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA[®]GENE EHEC/EPEC is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of genes encoding the virulence-factors of EHEC, STEC, EPEC, EIEC/*Shigella* spp. in human stool samples and cultures.^{1,2}

RIDA[®]GENE EHEC/EPEC real-time PCR is intended for use as an aid in diagnosis of gastroenteritis caused by pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp., respectively.

2. Summary and explanation of the test

Escherichia coli (*E. coli*) are gram negative, facultatively anaerobic rod bacteria, which move by peritrichal flagellation and belong to the Enterobacteriaceae family. *E. coli* are part of the normal intestinal flora of humans and many farm animals and are generally nonpathogenic. Some *E. coli* strains are pathogenic to humans through the acquisition of certain virulence factors (e.g. genes for toxins).

The six known intestinal pathogenic *E. coli*: enterohämorrhagic *E. coli* (EHEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) can be differentiated by the virulence factors.³

Enterohämorrhagic *E. coli* (EHEC) are currently the most important intestinal pathogenic *E. coli*. Every year about 1000 cases of illness due to an infection with enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) are reported in Germany.

EHEC are a subgroup of the Shigatoxin or Verotoxin producing *E. coli* (STEC or VTEC) and are capable to produce two cytotoxins, Verotoxin 1 and 2. Due to the similarity of the Verotoxins to the Shigatoxin of *Shigella dysenteriae*, the VTEC are also called STEC. Another important diagnostic virulence factor for EHEC is the *eae* gene (*E. coli* attaching and effacing gene) encoding intimin. By the detection of the *ipaH* gene (invasion plasmid antigen H) EHEC/STEC can be differentiated from *Shigella*/EIEC.

The clinical symptoms which are caused by EHEC range from mild diarrhoeas and severe gastroenteritis to haemorrhagic colitis which occurs in approx. 10 to 20 % of cases of infection. With 5 -10 % of infections, in babies and small children in particular as well as old patients or patients with weakened immune systems, this may also lead to a hemolytic uremic syndrome (HUS) or thrombotic

thrombocytopenic purpura (TTP) as a life-threatening post-infectious complication. With HUS and TTP, mortality is particularly high among infants (approx. 10 - 15%). Acute kidney failure with a temporary need for dialysis or an irreversible loss of the kidney function resulting in a constant need for dialysis may occur. The intensity of the clinical picture depends on the predisposition of the patient, but also on the corresponding EHEC phenotype; this means that the progress of the disease also depends on the different ways in which the virulence factors are expressed. Factors, which are still unknown today also play a role. The incubation period is approximately 2 to 10 days. Because of the high environmental resistance and the infective dose for EHEC is only at about 100 organisms. Sources of infection are contaminated foods from cattle, sheep or goats, particularly raw meat or meat products which have not been heated sufficiently, non-pasteurised raw or certified milk and contaminated fruits and vegetables. Infective chains from human to human, particularly in communal facilities such as kindergartens, homes for the elderly or hospitals, as well as direct contacts to animals are also important.^{4,5} Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) cause particularly in infants younger than 2 years diarrhea. The virulence factor for EPEC is also the *eae* gene.⁴

3. Test principle

The RIDA[®]GENE EHEC/EPEC is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of genes encoding the virulence-factors of EHEC, STEC, EPEC and EIEC/*Shigella* spp.

After DNA isolation, amplification of the gene fragments specific for the virulence factors *stx1/stx2*, *eae* and *ipaH* (if present) occurs. The amplified targets are detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA[®]GENE EHEC/EPEC assay contains an **Internal Control DNA** (ICD) as an internal control of sample preparation procedure and to determine possible PCR-inhibition.

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 reactions)

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	red
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the imprinted expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 – 8 °C).
- Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 – 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA[®]GENE EHEC/EPEC real-time PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

Tab. 2 Necessary equipment

Extraction platforms	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS [®] easyMAG [®]
Roche	MagNA Pure
Real-time PCR instruments	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler[®] 480II and the LightCycler[®] 480 z
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- PCR water (BioScience grade, nuclease-free water).

7. Precautions for users

For *in-vitro* diagnostic use.

This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com

8. Collection and storage of samples

8.1 Sample preparation from stool samples

For DNA isolation of human stool samples, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions.

We recommend to dilute the stool samples before extraction 1:3 with water. Vortex the diluted stool sample intensely and centrifuge at 1000 x g for 30 sec. Use from the supernatant the appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA[®]GENE EHEC/EPEC assay contains an **Internal Control DNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control DNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control DNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control DNA** should be added to the Master-Mix (see Tab.4).

If the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control DNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control DNA** should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the negative control and **Positive Control** PCR Mix.

8.2 Sample preparation from cultures

For DNA isolation of culture samples, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions.

For DNA isolation from culture the following procedure is recommended: Add 1 ml PCR water into a preparation tube. Collect colonies with an inoculation loop and suspend them in the prepared PCR water. Cut or break the inoculation loop stem. Cap the preparation tube tightly and vortex strongly for 60 seconds. Heat and shake the preparation tube at 95 °C for 10 min in a heating block. Centrifuge for 1 min at 13.000 x g and apply the supernatant as sample.

Note: Repeat the centrifugation step in case of strong turbidity (if necessary).

The RIDA[®]GENE EHEC/EPEC assay contains an **Internal Control DNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control DNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control DNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control DNA** should be added to the Master-Mix (see Tab.4).

If the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control DNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control DNA** should always be added to the specimen-PCR water mixture and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the negative control and **Positive Control** PCR Mix.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One **Positive Control** and one negative control must be included in each assay run.

We recommend calculating an additional volume of 10% to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and briefly centrifuge the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control DNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 – 8 °C).

Tab. 3: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

Tab. 4: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
D	Internal Control DNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

Negative control: Add 5 µl **No Template Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the negative control.

Sample: Add 5 µl DNA extract to the pre-pipetted Master-Mix.

Positive control: Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the positive control.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 DNA real-time PCR profile

Tab. 5: DNA real-time PCR profile for LightCycler® series and Rotor-Gene Q

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 6: DNA real-time PCR profile for Mx3005P, ABI 7500 and CFX96™

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

9.3.2 Universal real-time PCR profile

Note: The universal real-time PCR profile should only be used for DNA assays when combining RIDA® GENE DNA and RNA real-time PCR assays in one run.

Tab. 7: Universal real-time PCR profile for LightCycler® series

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 8: Universal real-time PCR profile for Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q and CFX96™

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

9.4 Detection channel set-up

Tab. 9: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Note
Roche LightCycler® 480II	stx1/stx2	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICD	533/580	
	ipaH	533/610	
	eae	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	stx1/stx2	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICD	540/580	
	ipaH	540/610	
	eae	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	stx1/stx2	FAM	Check that reference dye is none
	ICD	HEX	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
ABI 7500	stx1/stx2	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	stx1/stx2	FAM	-
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Qiagen Rotor-GENE Q	stx1/stx2	Green	The gain settings have to be set to 5, according to the default settings
	ICD	Yellow	
	ipaH	Orange	
	eae	Red	

10. Quality control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer`s instructions. Positive control and negative control have to show correct results (see Table 10, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3) in order to determine a valid run.

The **Positive Control** has a concentration of 10^3 copies/ μ l. In each PCR run it is used in a total amount of 5×10^3 copies.

Tab. 10: For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
Positive control	Positive	NA ^{*1}	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

^{*1} No Ct value is required for the ICR to make a positive call for the positive control.

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the negative control is not negative but the positive control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure

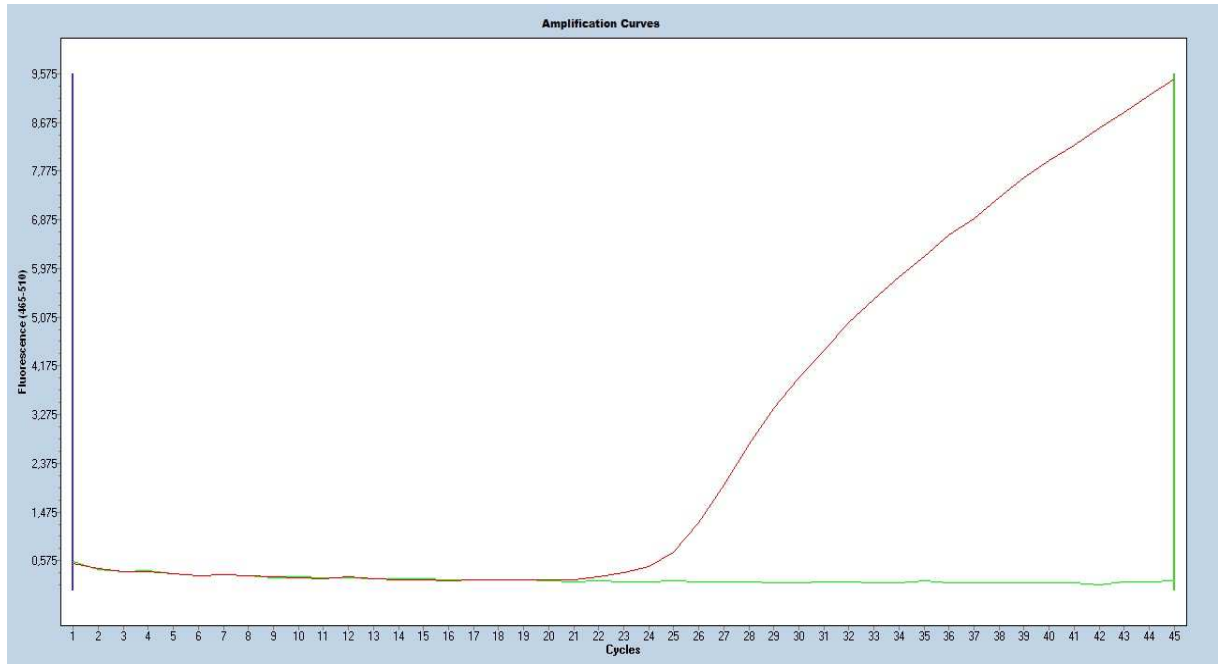


Fig. 1: Correct run of the positive and negative control (stx1/stx2) on the LightCycler® 480II

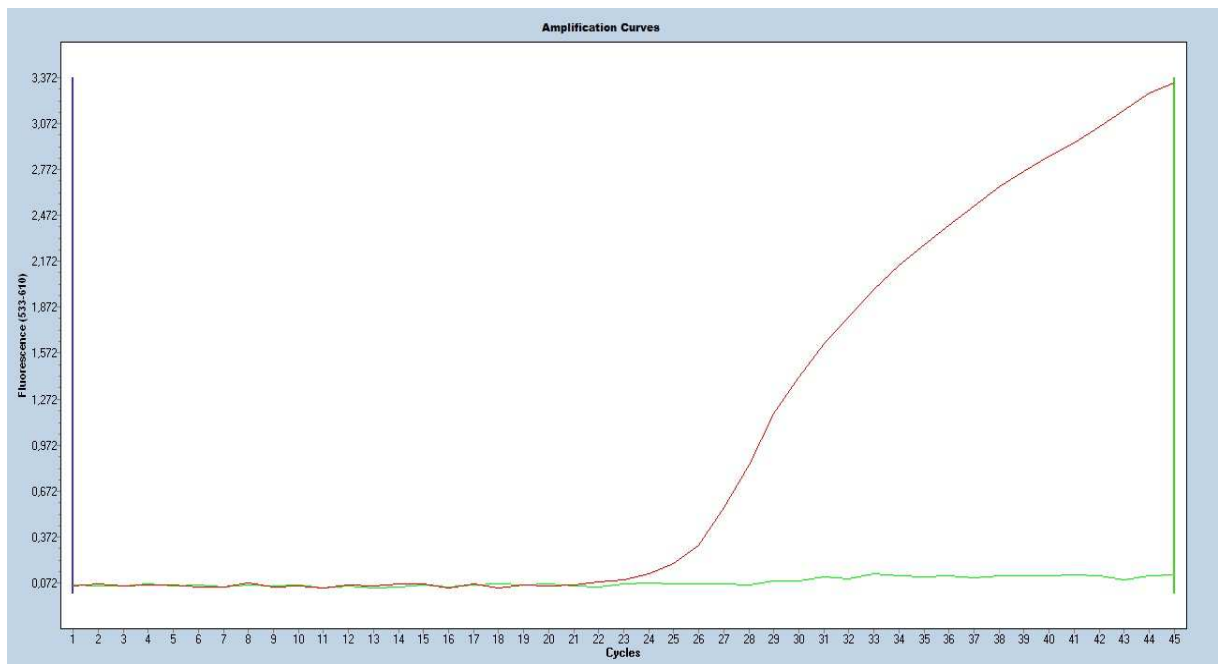


Fig. 2: Correct run of the positive and negative control (ipaH) on the LightCycler® 480II

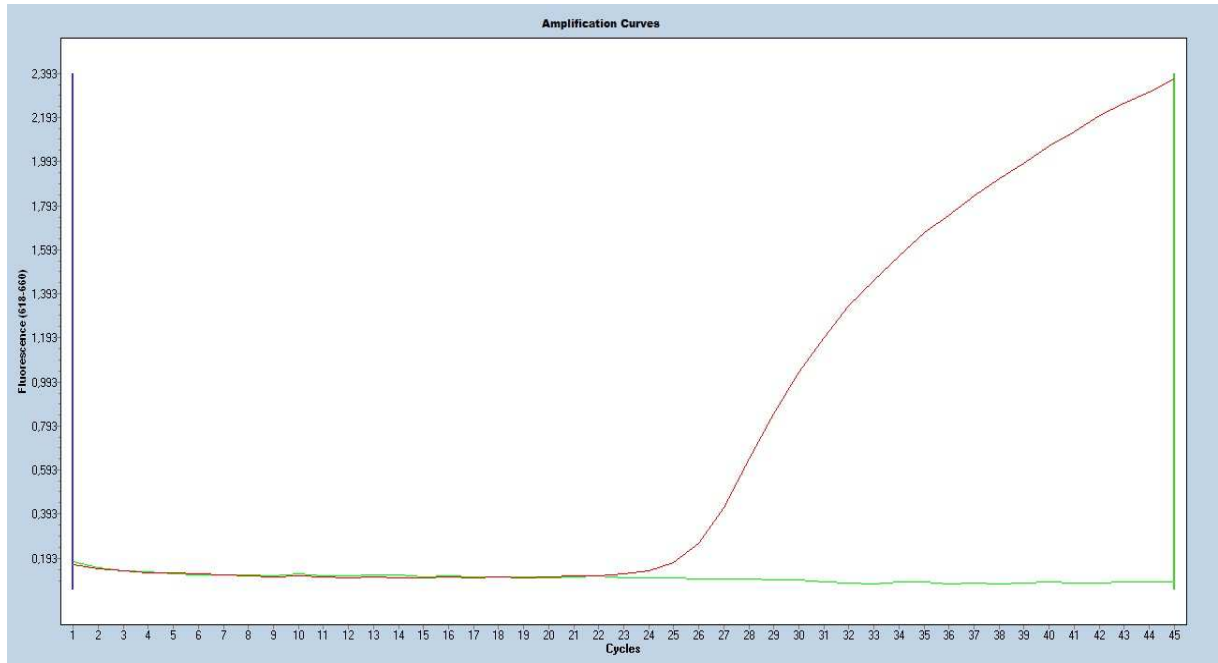


Fig. 3: Correct run of the positive and negative control (eae) on the LightCycler® 480II

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to table 11.

Tab.11: Sample interpretation

Virulence factor genes				
stx1/stx2	ipaH	eae	ICD	Result
positive	negative	negative	positive/negative	STEC (EHEC) detected
negative	positive	negative	positive/negative	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detected
negative	negative	positive	positive/negative	EPEC detected
positive	positive	negative	positive/negative	STEC (EHEC) and EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detected
positive	negative	positive	positive/negative	EHEC detected
negative	positive	positive	positive/negative	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. and EPEC detected
positive	positive	positive	positive/negative	EHEC and EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detected
negative	negative	negative	positive	Target genes not detected
negative	negative	negative	negative	Invalid

According to the German Infection Protection Act (IfSG) EHEC are those STEC (Shigatoxin-producing *E. coli*), which are pathogenic for humans. As there is no specific definition for human pathogenic STEC, each STEC has to be regarded as potential EHEC.⁵

A sample is evaluated negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the Internal Control DNA is positive. An inhibition of the PCR reaction or a failure in the extraction procedure can be excluded by the detection of the Internal Control DNA.

A sample is evaluated positive, if both, the sample and the Internal Control DNA, show an amplification signal in the detection system.

A sample is evaluated positive, if the sample shows an amplification signal in the detection system, but the Internal Control DNA is negative. The detection of the internal amplification control is not necessary, because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the internal amplification control.

A sample is evaluated invalid, if both, the sample and the Internal Control DNA show no amplification signal in the detection system. The sample contained a PCR inhibitor or a failure occurred in the extraction procedure. The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and re-amplified, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only validated for stool and culture samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a pathogen load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new variants resulting in a false negative result with the RIDA[®]GENE EHEC/EPEC assay.
6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the target genes (stx1/stx2, ipaH, eae).
8. Mucin can show interfering characteristics already in small quantities.

13. Performance characteristics

13.1 Analytical sensitivity

The RIDA[®] GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for stx1/stx2, ipaH and eae, respectively.

The following figures 4, 5 and 6 show a dilution series of stx1/stx2, ipaH and eae (each $10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II.

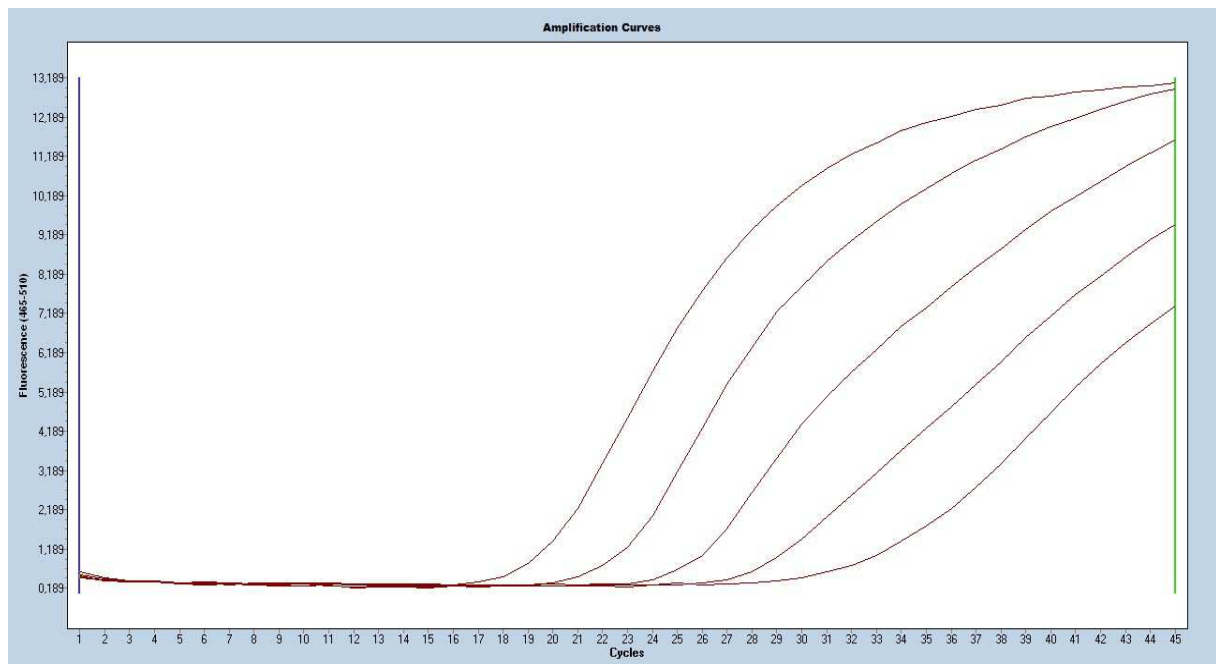


Fig. 4: Dilution series Shigatoxin genes stx1/stx2 ($10^5 - 10^1$ DNA copies/ μl) on the LightCycler[®] 480II

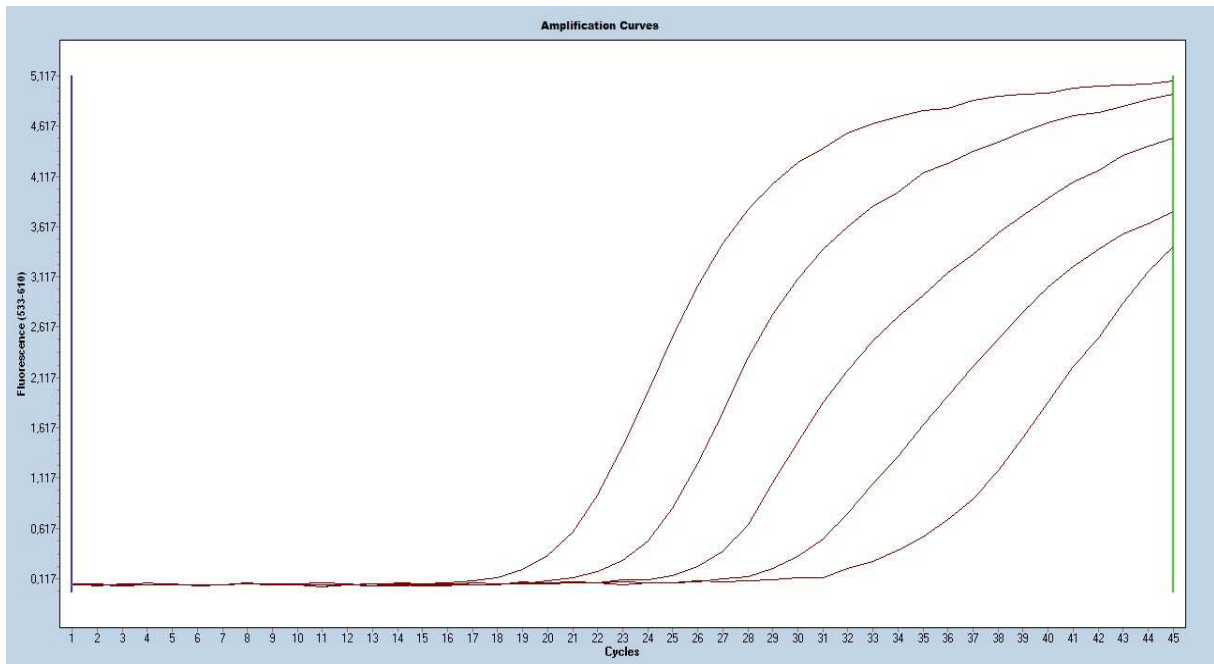


Fig. 5: Dilution series ipaH gene ($10^5 - 10^1$ DNA copies/ μ l) on the LightCycler[®] 480II

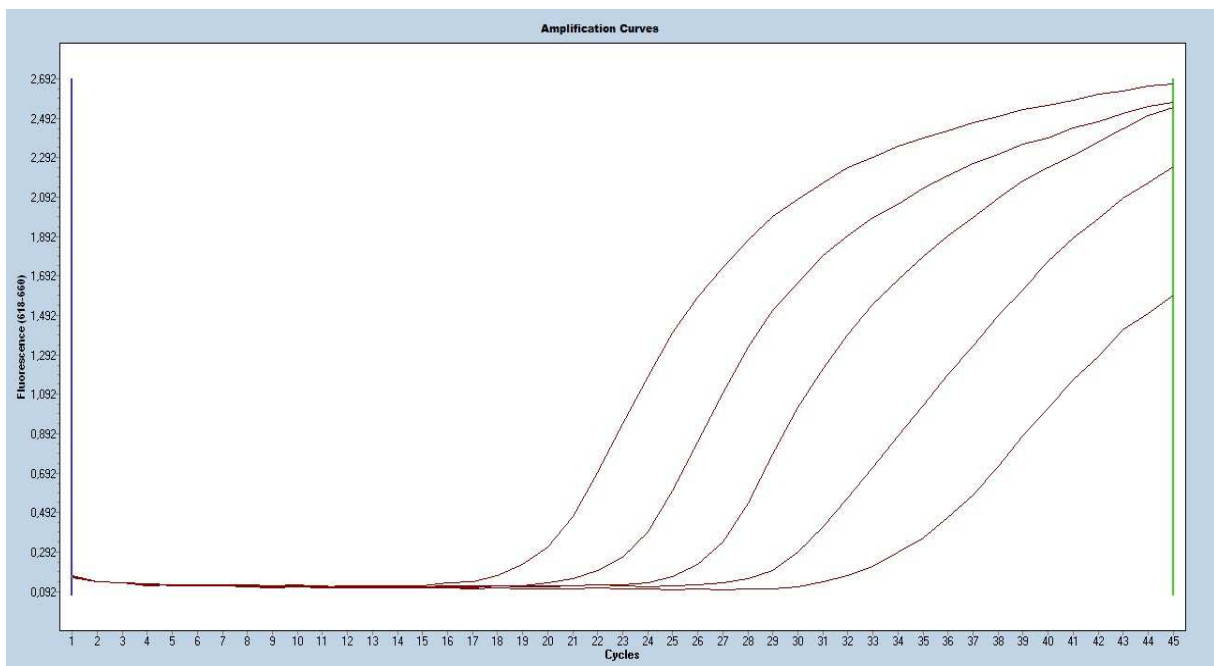


Fig. 6: Dilution series eae gene ($10^5 - 10^1$ DNA copies/ μ l) on the LightCycler[®] 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, DNA extraction and DNA concentration.

13.2 Analytical specificity

The RIDA[®] GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR is specific for stx1/stx2, ipaH and eae. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 12).

Tab. 12: Cross-reactivity testing

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

13.3 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA[®]GENE EHEC/EPEC real-time PCR was evaluated against multiple subtypes of the stx1 and stx2 gene as well as subtypes of the ipaH and eae gene (see Tab. 13). Below subtypes of stx1 and stx2 were detected by the RIDA[®]GENE EHEC/EPEC multiplex real-time PCR:

Tab.13: Analytical reactivity testing










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

14. Version history

Version number	Chapter and designation
2014-08-14	Release version
2018-08-24	General revision
2018-08-24	4. Reagents provided 6. Additional necessary reagents and necessary equipment 8. Collection and storage of samples 9. Test procedure 10. Quality control 11. Result interpretation 13. Performance characteristics 14. Version history 15. Explanation of symbols

15. Explanation of symbols

General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Testspecific symbols

Not applicable

16. Literature

1. Müller D, *et al.* Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73 (10): 3380–3390.
2. Thiem VD, *et al.* Detection of Shigella by a PCR Assay Targeting the ipaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
3. Kaper JM, *et al.* PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:123-140.
4. Nataro JP and Kaper JM. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(1): 132-201.
5. Robert Koch Institut. Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). RKI-Ratgeber für Ärzte 2008.

RIDA[®] GENE EHEC/EPEC

REF PG2205

1. Uso previsto

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

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

2. Resumen y descripción del ensayo

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

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

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

Los síntomas clínicos causados por ECEH van desde diarreas leves, pasando por gastroenteritis graves, hasta colitis hemorrágicas, que se producen en aproximadamente el 10 % al 20 % de los casos de infección. En el 5 - 10 % de las

infecciones, en particular en bebés y niños pequeños, así como en ancianos o pacientes inmunodeprimidos, también puede dar lugar a síndrome hemolítico urémico (SHU) o púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) como complicación potencialmente mortal de la infección. Con el SHU y la PTT, la mortalidad es especialmente elevada entre los lactantes (aprox. 10 - 15 %). Se puede producir insuficiencia renal aguda que requiera temporalmente diálisis, o una pérdida irreversible de la función renal que derive en una necesidad constante de diálisis. La intensidad del cuadro clínico depende de la predisposición del paciente, pero también del fenotipo correspondiente de ECEH; esto significa que el progreso de la enfermedad también depende de las diferentes formas en que se expresan los factores de virulencia. También participan factores aún desconocidos en este momento. El periodo de incubación es de aproximadamente 2 a 10 días. Debido a la elevada resistencia medioambiental, la dosis infecciosa de ECEH es de tan solo aproximadamente 100 microorganismos. Las fuentes de infección son los alimentos contaminados procedentes del ganado ovino o caprino, en particular la carne cruda o los productos cárnicos que no se hayan cocido lo suficiente, la leche cruda no pasteurizada o certificada, y las frutas y verduras contaminadas. Las cadenas infecciosas de persona a persona, en especial en centros comunitarios como guarderías, hogares de ancianos u hospitales, así como el contacto directo con animales también son importantes.^{4,5}

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

3. Principio del ensayo

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

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

4. Reactivos suministrados

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

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

5. Instrucciones de almacenamiento

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

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

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

Tabla 2 Equipamiento necesario

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

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

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

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

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

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

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

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

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

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

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

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

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

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

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

8.2 Preparación de la muestra a partir de cultivos

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

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

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

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

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

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

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

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

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

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

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

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

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

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

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

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

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

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

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

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

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

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

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

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

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

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

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

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

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

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

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

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

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

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

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

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

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

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

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

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

10. Control de calidad

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

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

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

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

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

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

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

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

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

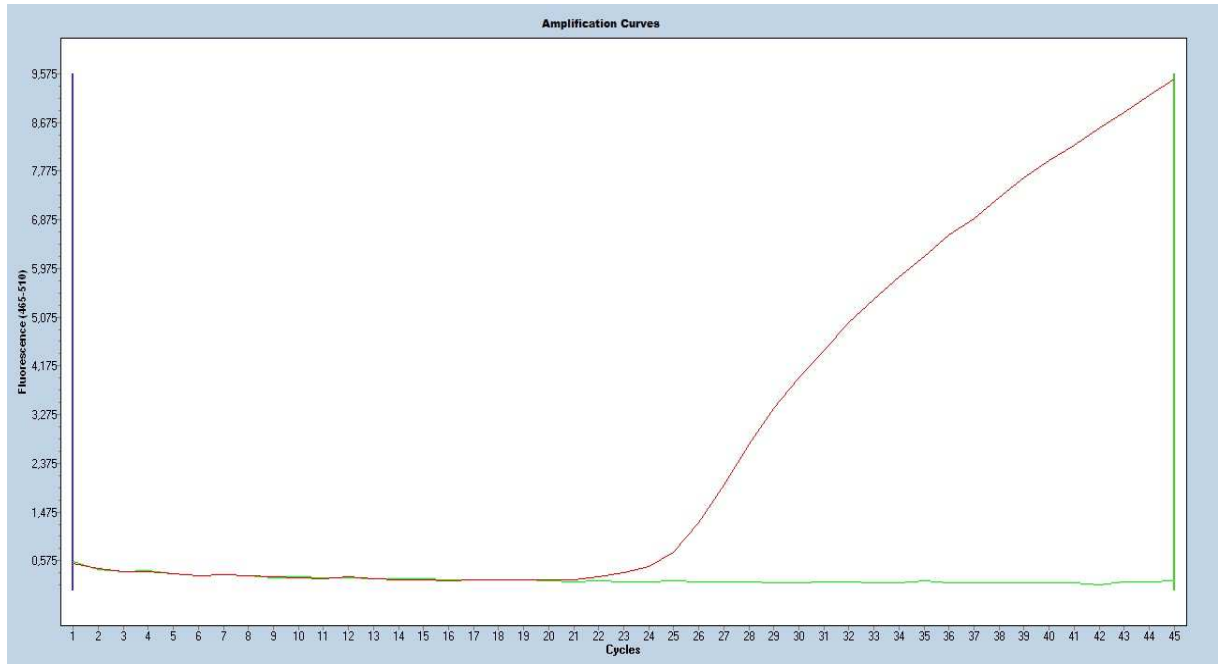


Fig. 1: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (stx1/stx2) en el LightCycler® 480II

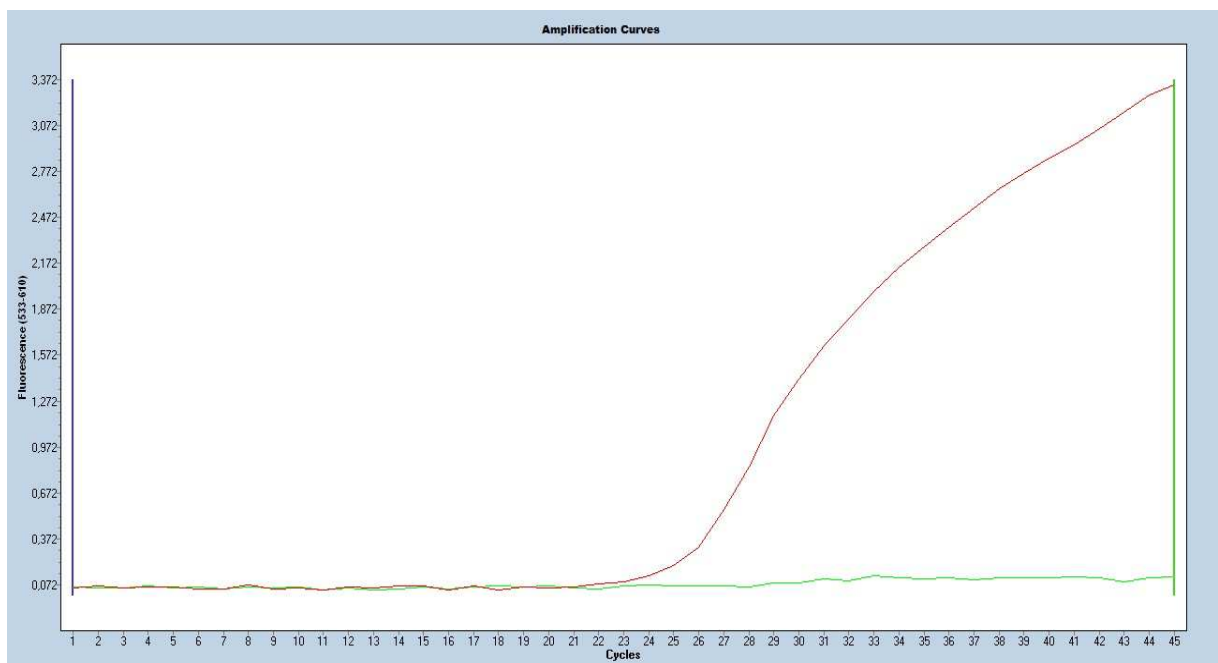


Fig. 2: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (ipaH) en el LightCycler® 480II

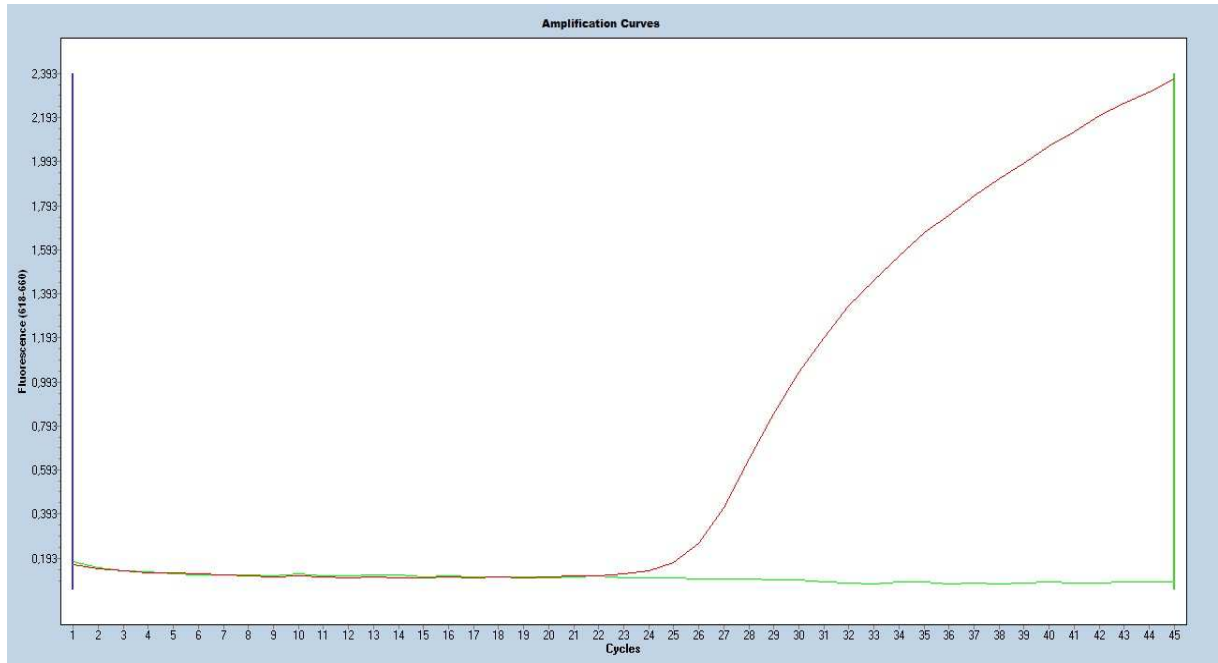


Fig. 3: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (eae) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

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

Tabla 11: Interpretación de las muestras

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

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

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

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

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

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

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

12. Limitaciones del método

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

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

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

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

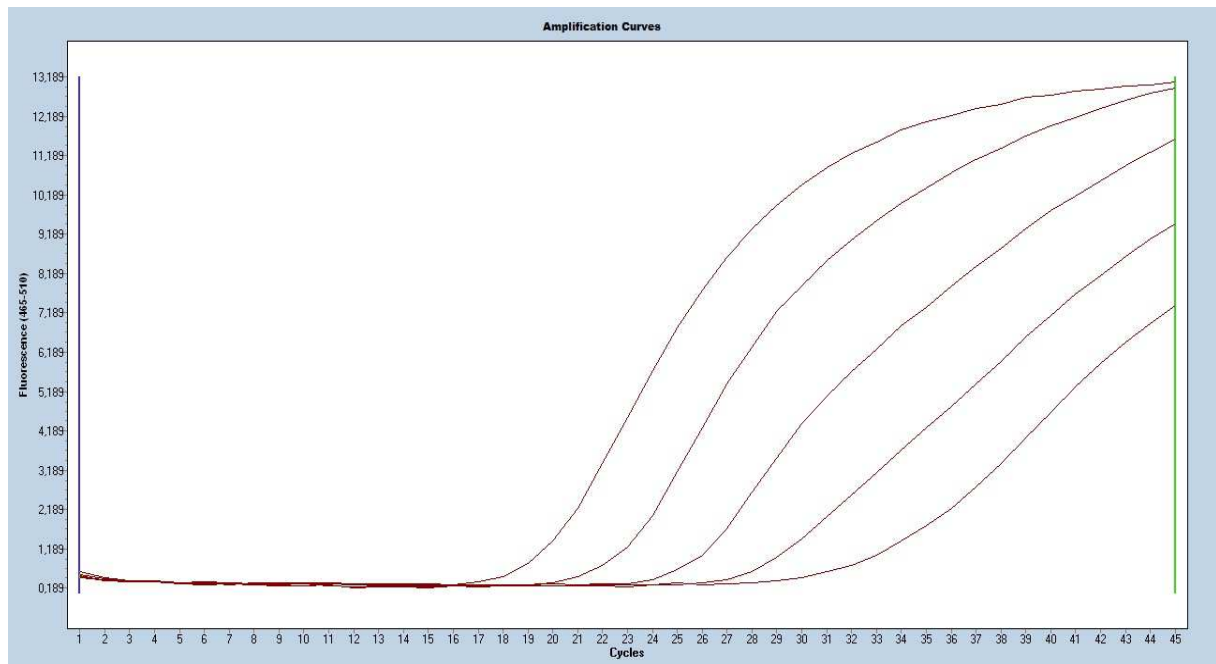


Fig. 4: Dilución seriada de los genes de la toxina Shiga stx1/stx2 (10^5 a 10^1 copias de ADN/ μl) en el LightCycler® 480II

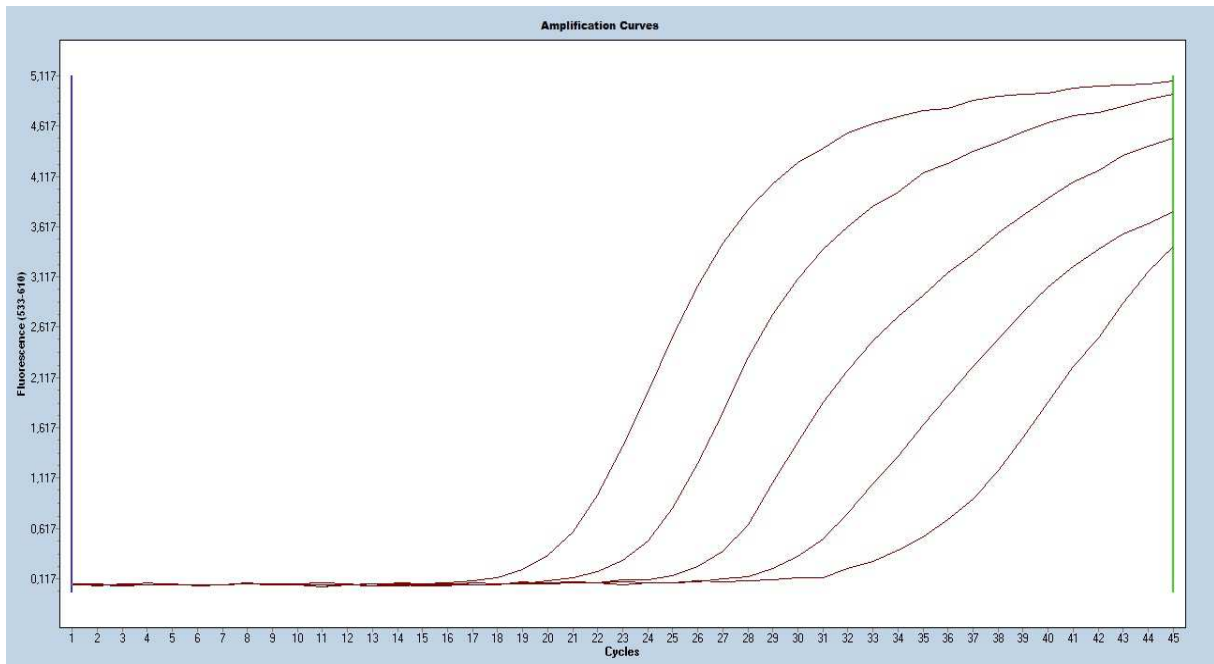


Fig. 5: Dilución seriada del gen ipaH (10^5 a 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler[®] 480II

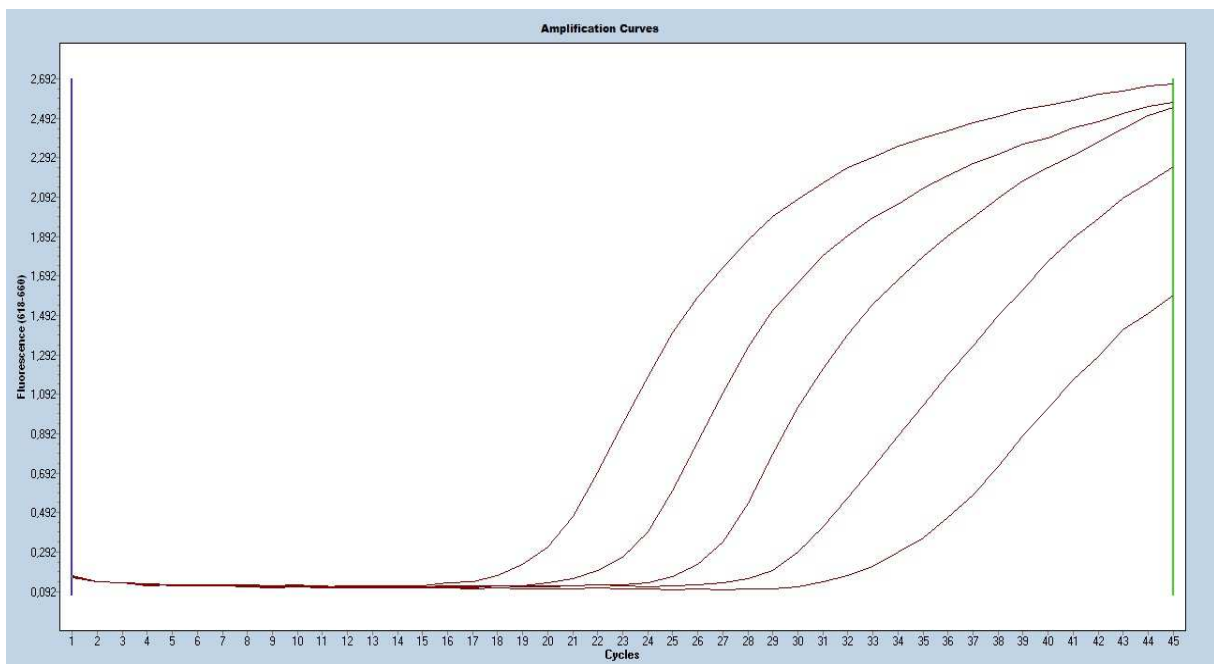


Fig. 6: Dilución seriada del gen eae (10^5 a 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler[®] 480II

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

13.2 Especificidad analítica

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

Tabla 12: Ensayos de reactividad cruzada

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

13.3 Reactividad analítica

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

Tab.13: Pruebas de reactividad analítica










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

14. Historial de versiones

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

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

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

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

1. Müller D, *et al.* Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73 (10): 3380–3390.
2. Thiem VD, *et al.* Detection of Shigella by a PCR Assay Targeting the ipaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
3. Kaper JM, *et al.* PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:123-140.
4. Nataro JP and Kaper JM. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(1): 132-201.
5. Robert Koch Institut. Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). RKI-Ratgeber für Ärzte 2008.

RIDA[®] GENE EHEC/EPEC

REF PG2205

1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA[®] GENE EHEC/EPEC est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation des gènes codant pour les facteurs de virulence d'ECEH, STEC, ECEP, ECEI/*Shigella* spp. dans des échantillons et des cultures de selles humaines^{1,2}.

Le test de PCR en temps réel RIDA[®] GENE EHEC/EPEC est destiné à faciliter le diagnostic de la gastro-entérite provoquée par des *Escherichia coli* et *Shigella* spp. pathogènes, respectivement.

2. Résumé et explication du test

Les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des bactéries à Gram négatif et facultativement anaérobies en forme de bâtonnet qui se déplacent par flagellation péritriche. Elles appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae. Les *E. coli* font normalement partie de la flore intestinale des humains et de nombreux animaux d'élevage. Ils ne sont généralement pas pathogènes. Certaines souches d'*E. coli* sont pathogènes pour les humains par acquisition de certains facteurs de virulence (par ex., des gènes codant pour des toxines).

Les six agents pathogènes connus d' *E. coli* dans l'intestin sont : *E. coli* entérohémorragique (ECEH), *E. coli* entéropathogène (ECEP), *E. coli* entérotoxigène (ECET), *E. coli* entéro-invasif (ECEI), *E. coli* entéro-agrégatif (ECEA) et *E. coli* à adhésion diffuse (ECAD) et ils peuvent être différenciés par les facteurs de virulence³. Les *E. coli* entérohémorragiques (ECEH) sont actuellement les *E. coli* pathogènes les plus importants dans l'intestin. Chaque année, environ 1 000 cas de maladies dues à une infection par *E. coli* entérohémorragiques (ECEH) sont signalés en Allemagne. Les ECEH sont un sous-groupe des *E. coli* produisant des toxines de Shiga (STEC) ou des vérotoxines (VTEC) et ils ont la capacité de produire deux cytotoxines, les vérotoxines 1 et 2. En raison de la ressemblance entre les vérotoxines et les shigatoxines de *Shigella dysenteriae*, les VTEC sont aussi dénommées STEC. Un autre facteur de virulence important pour le diagnostic pour les ECEH est le gène *eae* (gène attachant-effaçant d'*E. coli*) codant l'intimine. La détection du gène *ipaH* (gène H de l'antigène du plasmide d'invasivité) permet de différencier les ECEH/STEC des *Shigella*/ECEI.

Les symptômes cliniques déclenchés par les ECEH vont de la diarrhée légère à la gastro-entérite sévère en passant par la colite hémorragique et surviennent dans environ 10 à 20 % des cas d'infection. Avec 5 à 10 % des infections, chez les bébés et les enfants en bas âge en particulier ainsi que chez les patients âgés ou ceux dont le système immunitaire est affaibli, cela peut également entraîner un syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) en tant que complication post-infectieuse mettant en danger la vie du patient. Avec le SHU et le PPT, le taux de mortalité est particulièrement élevé chez les enfants (environ 10 à 15 %). Des insuffisances rénales aiguës peuvent se produire avec nécessité temporaire de dialyse ou perte irréversible de la fonction rénale entraînant un besoin constant de dialyse. L'intensité du tableau clinique dépend de la prédisposition du patient, mais également du phénotype d'ECEH correspondant ; cela signifie que la progression de la maladie dépend également des différentes façons dont les facteurs de virulence s'expriment. Des facteurs, encore inconnus de nos jours, jouent également un rôle. La durée de la période d'incubation est environ de 2 à 10 jours. À cause de la forte résistance environnementale, la dose infectieuse d'ECEH est uniquement d'environ 100 organismes. Les sources d'infection sont les aliments contaminés provenant des espèces bovines, ovines ou caprines, en particulier la viande crue ou des produits à base de viande qui n'ont pas été suffisamment chauffés, le lait cru non pasteurisé ou certifié et les fruits et légumes contaminés. Les chaînes infectieuses d'homme à homme, en particulier dans les structures collectives comme les crèches, résidences pour personnes âgées ou hôpitaux, ainsi que les contacts directs avec des animaux sont également importants^{4,5}.

L'*E. coli* entérotoxigène (ECEP) provoque des diarrhées, en particulier chez les enfants de moins de 2 ans. Le facteur de virulence pour l'ECEP est également le gène *eae*⁴.

3. Principe du test

Le test RIDA[®]GENE EHEC/EPEC est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation des gènes codant pour les facteurs de virulence d'ECEH, STEC, ECEP, ECEI/*Shigella* spp.

Après isolation de l'ADN survient l'amplification des fragments de gène spécifiques aux facteurs de virulence *stx1/stx2*, *eae* et *ipaH* (si présents). Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la Taq-Polymerase rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA[®]GENE EHEC/EPEC contient un Internal Control DNA (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 réactions)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rouge
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel RIDA® GENE EHEC/EPEC peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

Tableau 2 Matériel nécessaire

Plateformes d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS® easyMAG®
Roche	MagNA Pure
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 480II et le LightCycler® 480 z
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (eau de qualité BioScience, sans nucléase).

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'échantillon à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ADN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer les échantillons de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/3. Agiter fortement l'échantillon de selles dilué et le centrifuger à 1 000 x g pendant 30 s. Utiliser le volume adéquat du surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA[®] GENE EHEC/EPEC inclut un Internal Control DNA qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. Le Internal Control DNA peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si le Internal Control DNA est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. Le **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl de **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

8.2 Préparation des échantillons à partir des cultures

Pour isoler l'ADN des échantillons de cultures, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Pour isoler l'ADN de la culture, il est recommandé de suivre la procédure suivante : Ajouter 1 ml d'eau de PCR dans un tube de préparation. Recueillir les colonies à l'aide d'une anse de prélèvement et les suspendre dans l'eau de PCR préparée. Couper ou casser la tige de l'anse de prélèvement. Fermer hermétiquement le tube de préparation et l'agiter vigoureusement pendant 60 secondes. Chauffer et agiter le tube de préparation à 95 °C pendant 10 min dans un bloc chauffant. Centrifuger pendant 1 min à 13 000 x g et recueillir le surnageant en tant qu'échantillon.

Remarque : en présence d'une forte turbidité, recommencer l'étape de centrifugation (si nécessaire).

Le test RIDA[®] GENE EHEC/EPEC inclut un **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10% pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], le [Positive Control], le [No Template Control] et le [Internal Control DNA] avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

Tableau 3 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

Tableau 4 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
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

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

Contrôle négatif : Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si le **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

Échantillon : Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN au mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif : Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si le **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (tableaux 5, 6, 7, 8).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

Tableau 5 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI 7500 et CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel RIDA® GENE DNA et ARN sont effectués lors d'une même exécution.

Tableau 7 : Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler®

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 8 : Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 480II	stx1/stx2	465/510	Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
	ipaH	533/610	
	eae	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	stx1/stx2	465/510	Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	540/580	
	ipaH	540/610	
	eae	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	stx1/stx2	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
ABI 7500	stx1/stx2	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	stx1/stx2	FAM	-
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Qiagen Rotor-GENE Q	stx1/stx2	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	
	ipaH	Orange	
	eae	Rouge	

10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 10, figures 1, 2 et 3) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

Tableau 10 : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O ^{*1}	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

^{*1} Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test

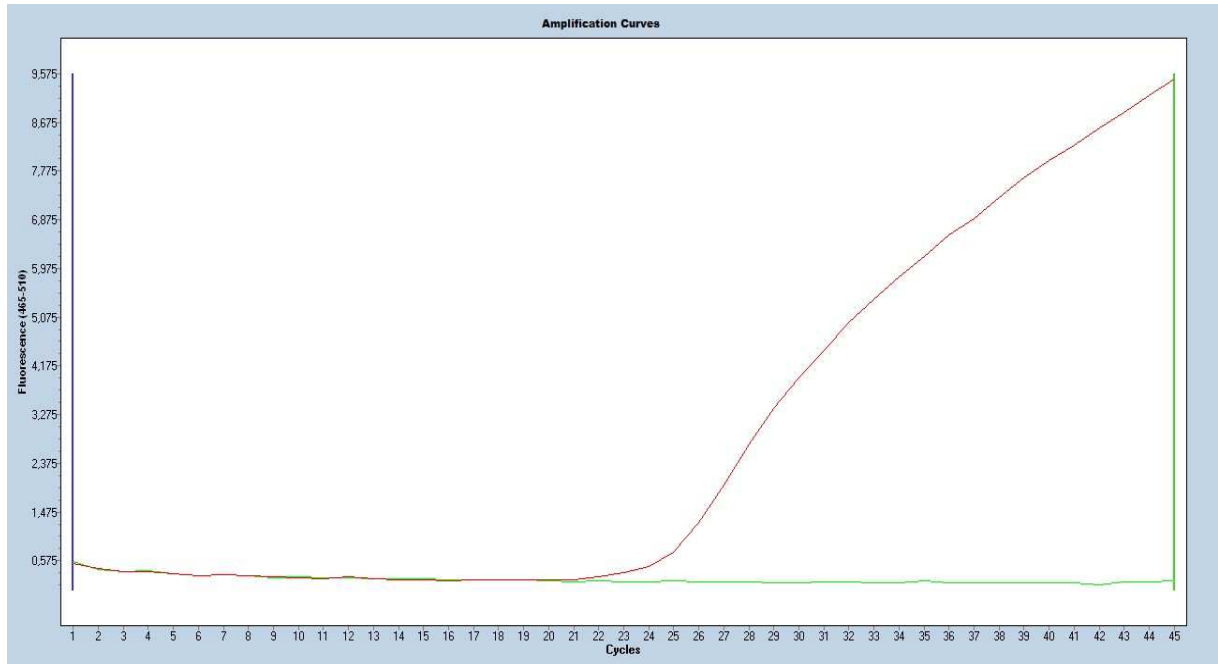


Figure 1 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (stx1/stx2) sur le LightCycler® 480II

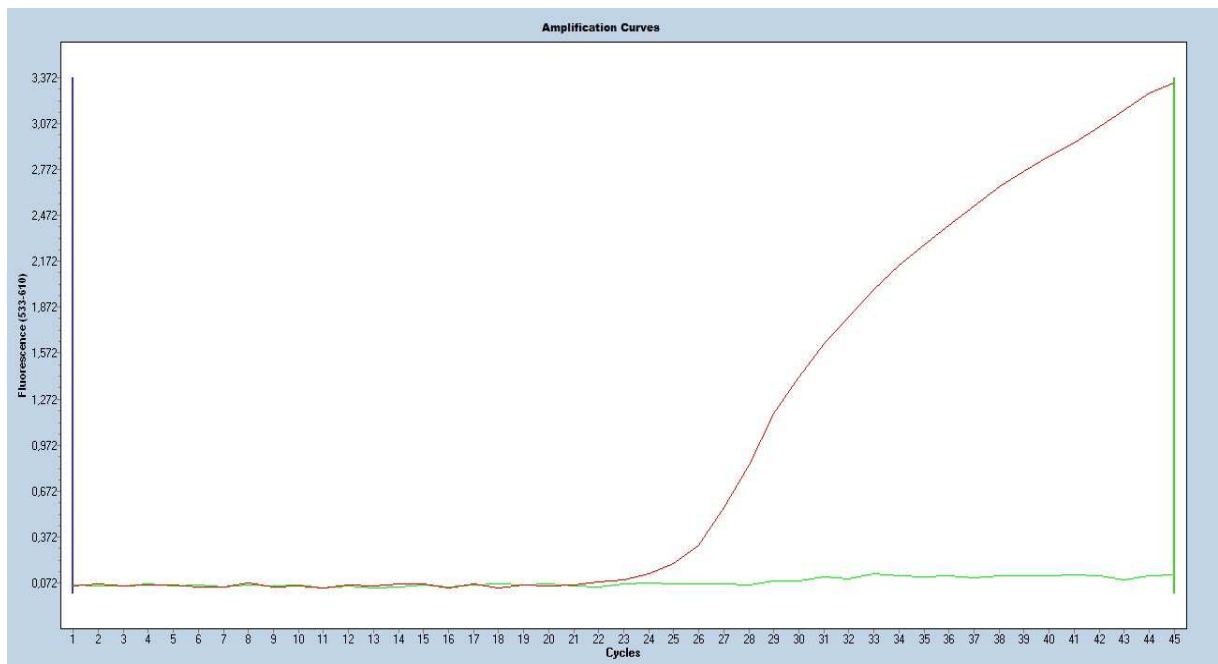


Figure 2 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (ipaH) sur le LightCycler® 480II

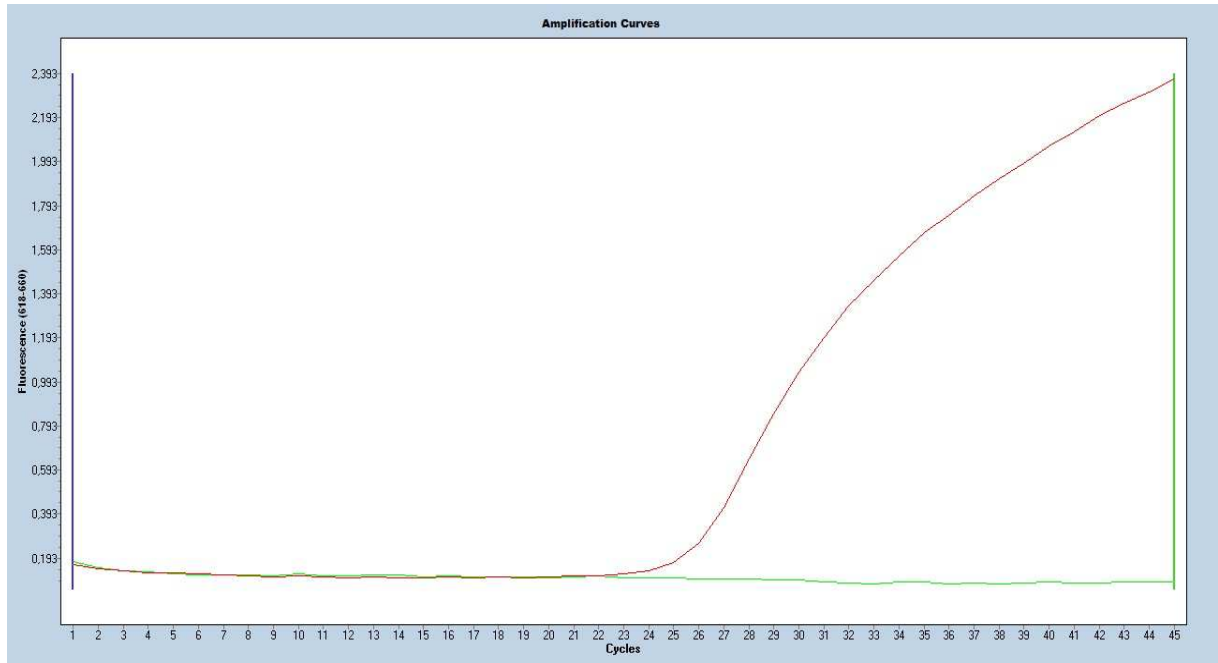


Fig. 3 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (eae) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

Tableau 11 : Interprétation des échantillons

Gènes des facteurs de virulence				
stx1/stx2	ipaH	eae	ICD	Résultat
positif	négatif	négatif	positif/négatif	STEC (ECEH) détecté
négatif	positif	négatif	positif/négatif	ECEI/ <i>Shigella</i> spp. détectés
négatif	négatif	positif	positif/négatif	ECEP détecté
positif	positif	négatif	positif/négatif	STEC (ECEH) et ECEI/ <i>Shigella</i> spp. détectés
positif	négatif	positif	positif/négatif	ECEH détecté
négatif	positif	positif	positif/négatif	ECEI/ <i>Shigella</i> spp. et ECEP détectés
positif	positif	positif	positif/négatif	ECEH et ECEI/ <i>Shigella</i> spp. détectés
négatif	négatif	négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide

Selon la loi allemande relative à la protection contre les infections (IfSG), les ECEH sont des STEC (*E. coli* produisant des shigatoxines) qui sont pathogènes pour les humains. Puisqu'il n'existe aucune définition spécifique des STEC pathogènes pour les humains, chaque STEC doit être considéré comme un ECEH potentiel⁵.

Un échantillon est estimé négatif s'il ne montre aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais le Internal Control DNA est positif. Une inhibition de la réaction de PCR ou un échec de la procédure d'extraction peuvent être exclus par la détection du Internal Control DNA.

Un échantillon est estimé positif si à la fois l'échantillon et le Internal Control DNA présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est estimé positif s'il présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais le Internal Control DNA est négatif. La détection du contrôle d'amplification interne n'est pas nécessaire, car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent du contrôle d'amplification interne.

Un échantillon est estimé non valide si à la fois l'échantillon et le **Internal Control DNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR ou la procédure d'extraction est défectueuse. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est uniquement validé pour les échantillons de selles et de cultures.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA[®]GENE EHEC/EPEC.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence des gènes cibles (stx1/stx2, ipaH, eae).
8. La mucine peut présenter des caractéristiques d'interférence, même en petites quantités.

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®] GENE EHEC/EPEC est ≥ 10 copies d'ADN par réaction pour stx1/stx2, ipaH et eae, respectivement.

Les figures 4, 5 et 6 suivantes montrent la série de dilutions de stx1/stx2, ipaH et eae ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl chacune) dans le LightCycler[®] 480II.

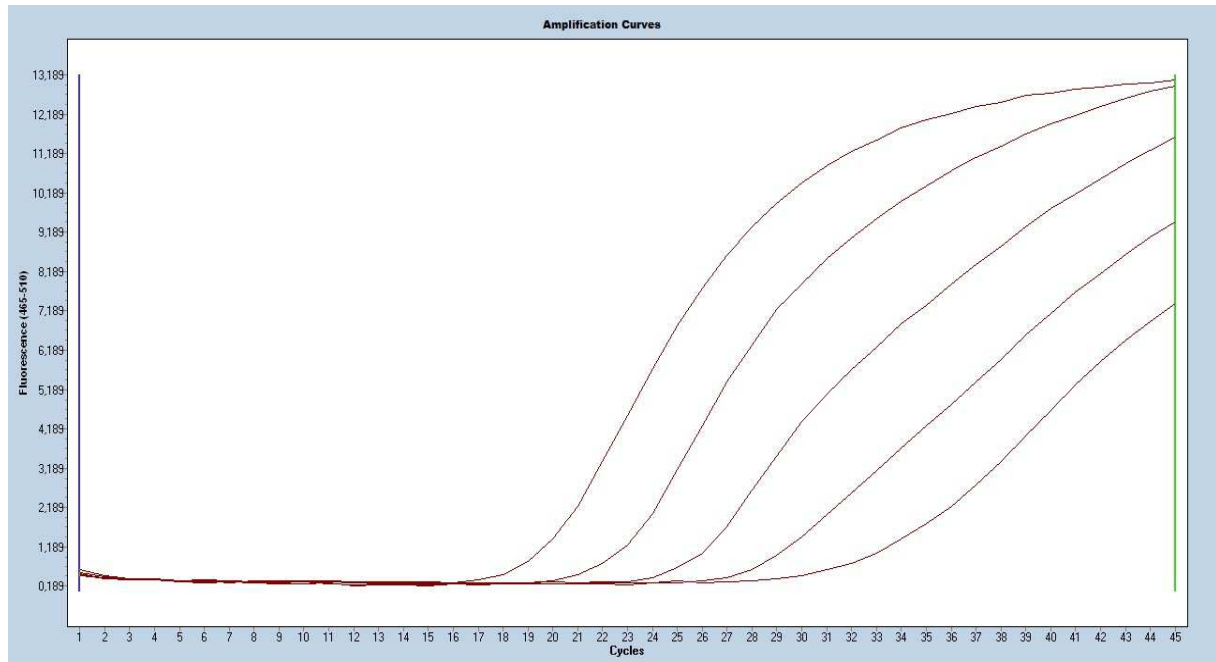


Figure 4 : Série de dilutions pour les gènes shigatoxines stx1/stx2 (10^5 à 10^1 copies d'ADN/ μl) avec le LightCycler[®] 480II

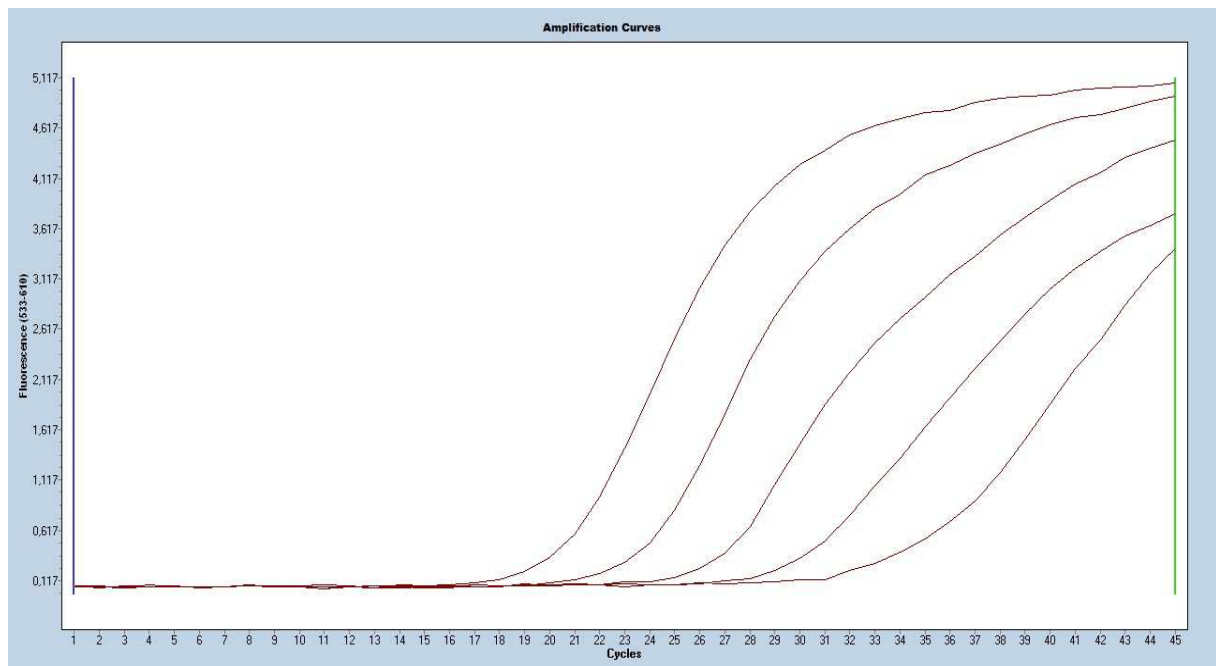


Fig. 5 : Série de dilutions pour le gène ipaH (10^5 à 10^1 copies d'ADN/ μ l) avec le LightCycler® 480II

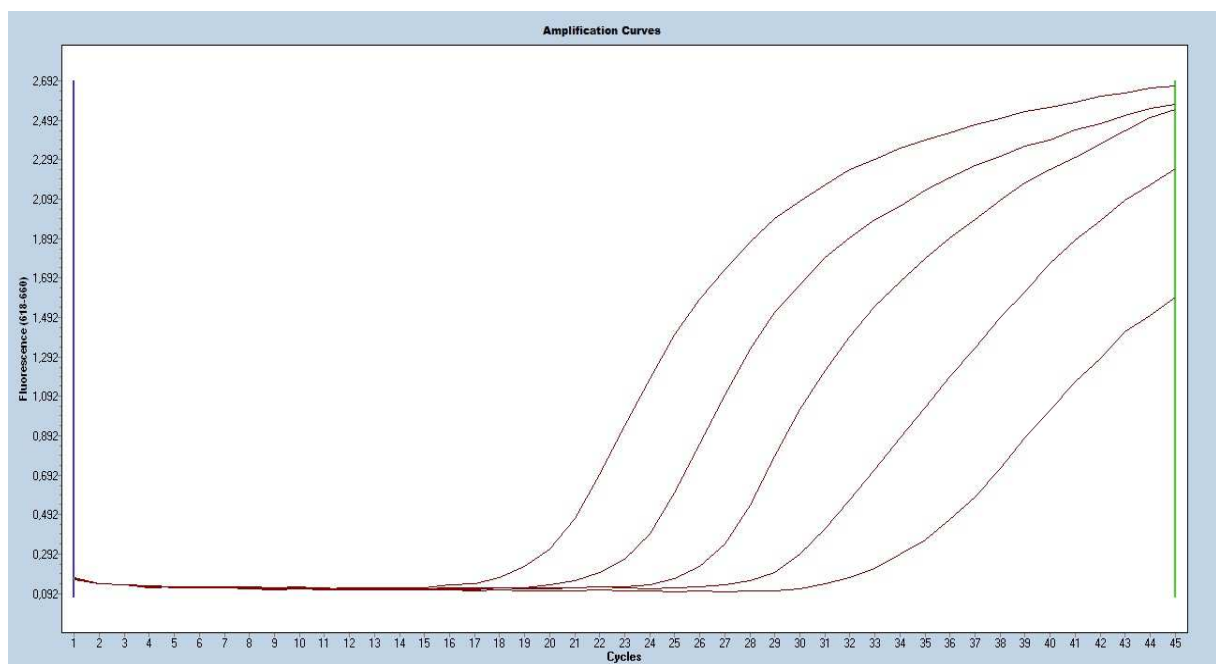


Fig. 6 : Série de dilutions pour le gène eae (10^5 à 10^1 copies d'ADN/ μ l) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

13.2 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE EHEC/EPEC est spécifique pour stx1/stx2, ipaH et eae. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 12).

Tableau 12 : Test de la réactivité croisée

Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus GI	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GII	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	<i>E.coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> sous-esp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-				

13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel RIDA®GENE EHEC/EPEC a été évaluée par rapport à de multiples sous-types de gènes stx1 et stx2 ainsi qu'à des sous-types des gènes ipaH et eae (voir tableau 13). Les sous-types de stx1 et stx2 suivants ont été détectés par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE EHEC/EPEC :

Tableau 13 : Test de la réactivité analytique










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

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2014-08-14	Version de la publication
2018-08-24	Révision générale
2018-08-24	4. Contenu du paquet 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 8. Prélèvement et conservation des échantillons 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 11. Interprétation des résultats 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Sans objet

16. Bibliographie

1. Müller D, *et al.* Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73 (10): 3380–3390.
2. Thiem VD, *et al.* Detection of Shigella by a PCR Assay Targeting the ipaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
3. Kaper JM, *et al.* PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:123-140.
4. Nataro JP and Kaper JM. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(1): 132-201.
5. Robert Koch Institut. Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). RKI-Ratgeber für Ärzte 2008.

RIDA[®] GENE EHEC/EPEC

REF PG2205

1. Campo di applicazione

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

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

2. Sintesi e spiegazione del test

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

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

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

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

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

I sintomi clinici causati da EHEC variano da forme lievi di diarrea a gastroenteriti gravi fino alla colite emorragica, che insorge in circa il 10 - 20 % delle infezioni. Con il 5 - 10 % delle infezioni, in particolare nei neonati e bambini piccoli, così come in

pazienti anziani o pazienti con sistema immunitario indebolito, questo può anche causare sindrome uremica emolitica (HUS) o porpora trombocitopenica trombotica (TTP), una complicanza post-infettiva che mette a rischio la vita. Nel caso di HUS e TTP, la mortalità è particolarmente elevata tra i neonati (circa 10 - 15 %). Può verificarsi insufficienza renale acuta con un bisogno temporaneo di dialisi o una perdita irreversibile della funzione renale e conseguente necessità costante di dialisi. L'intensità del quadro clinico dipende dalla predisposizione del paziente, ma anche dal corrispondente fenotipo EHEC; questo significa che il progresso della malattia dipende anche dai diversi modi in cui sono espressi i fattori di virulenza. Inoltre, sono coinvolti alcuni fattori ancora oggi sconosciuti. Il periodo di incubazione è di circa 2 - 10 giorni. A causa della elevata resistenza ambientale, la dose infettante per EHEC è solo di circa 100 organismi. Le fonti di infezione sono alimenti contaminati da bovini, ovini o caprini, particolarmente carne cruda o prodotti della carne che non sono stati riscaldati a sufficienza, latte crudo non pastorizzato o certificato e frutta e verdura contaminata. L'infezione passa da una persona all'altra, soprattutto nelle strutture comunitarie come asili, case di riposo od ospedali, senza contare l'importanza dei contatti diretti con gli animali.^{4,5}

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

3. Principio del test

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

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

4. Contenuto della confezione

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

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

5. Istruzioni di conservazione

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

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

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

Tabella 2 Attrezzatura necessaria

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

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

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

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

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

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

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

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

- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

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

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

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

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

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

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

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

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

8.2 Preparazione del campione da colture

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

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

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

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

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

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

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

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

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

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

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

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

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

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
D	[Internal Control DNA]	1,0 µl	11 µl
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

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

9.2 Preparazione della PCR Mix

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

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

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

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

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

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

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

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo della PCR real-time per DNA

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

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

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

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

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

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

9.3.2 Profilo della PCR real-time universale

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

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

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

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

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

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

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

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	stx1/stx2	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
	ipaH	533/610	
	eae	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	stx1/stx2	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
	ipaH	540/610	
	eae	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	stx1/stx2	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICD	HEX	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
ABI 7500	stx1/stx2	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	stx1/stx2	FAM	-
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Qiagen Rotor-GENE Q	stx1/stx2	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICD	Giallo	
	ipaH	Arancione	
	eae	Rosso	

10. Controllo qualità

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

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

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

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

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

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

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

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

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

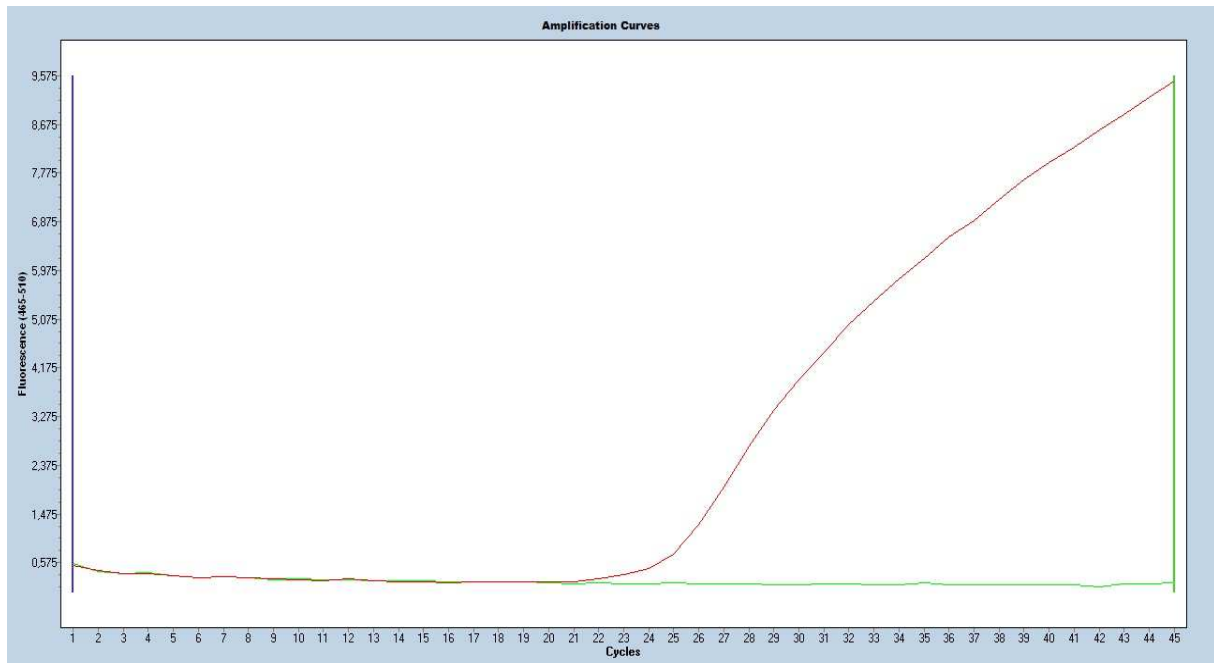


Fig. 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (stx1/stx2) sul LightCycler® 480II

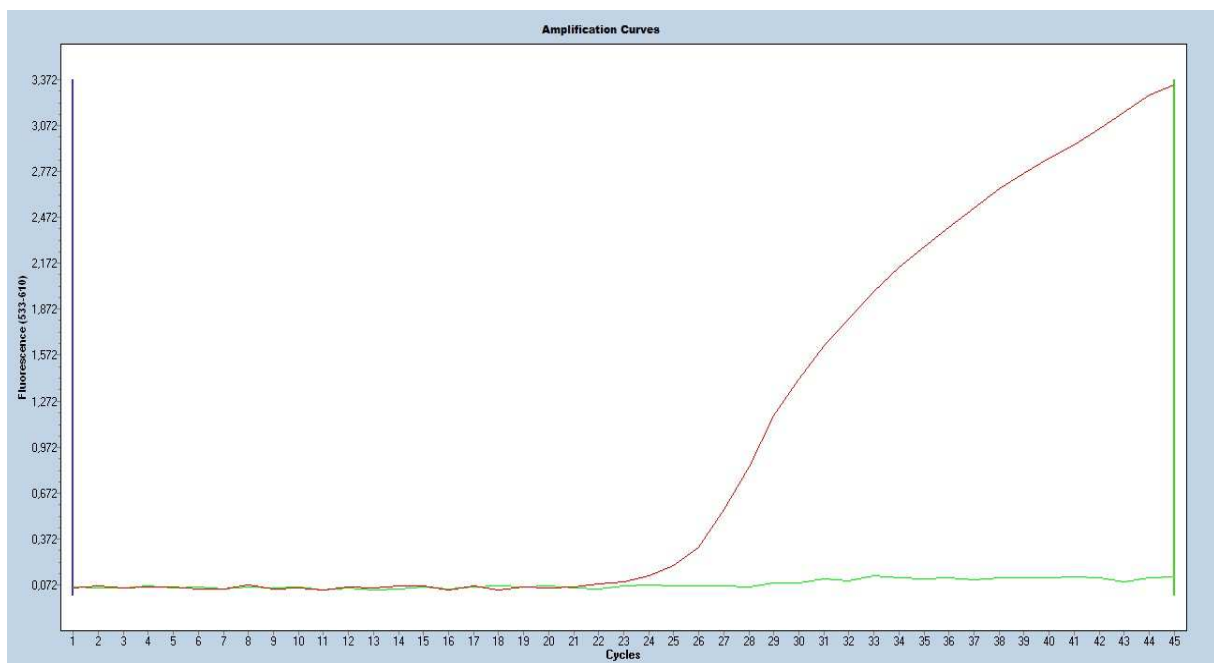


Fig. 2: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (ipaH) sul LightCycler® 480II

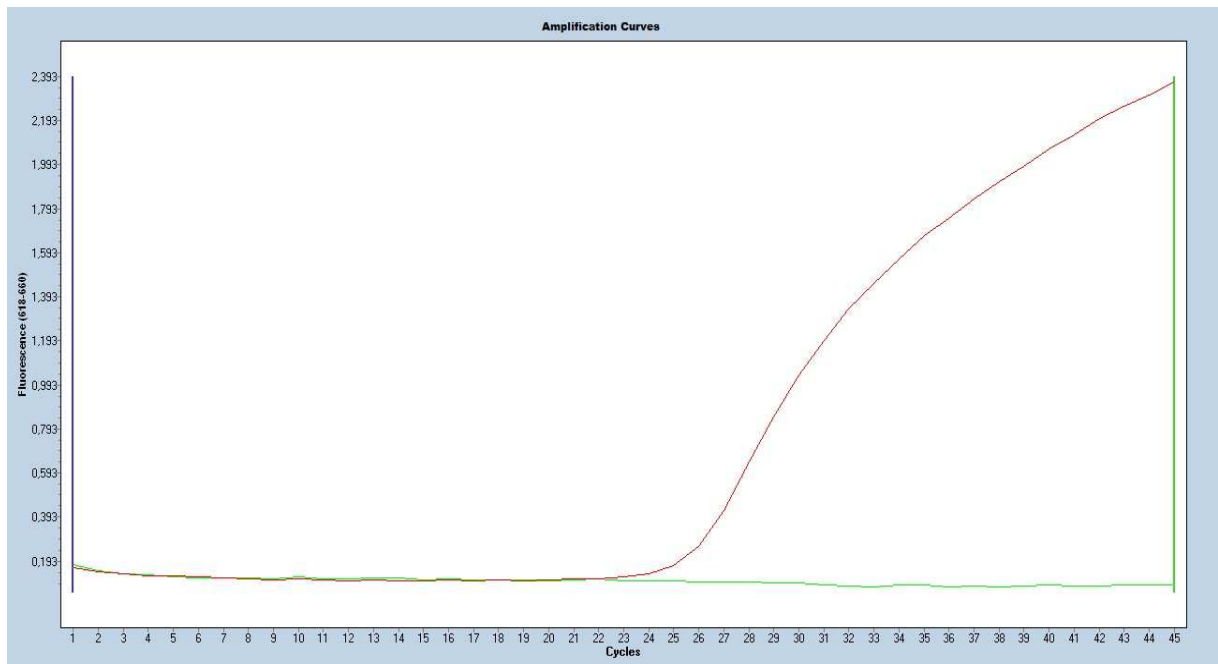


Fig. 3: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (eae) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

Tabella 11: Interpretazione del campione

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

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

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

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

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

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

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

12. Limiti del metodo

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

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

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

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

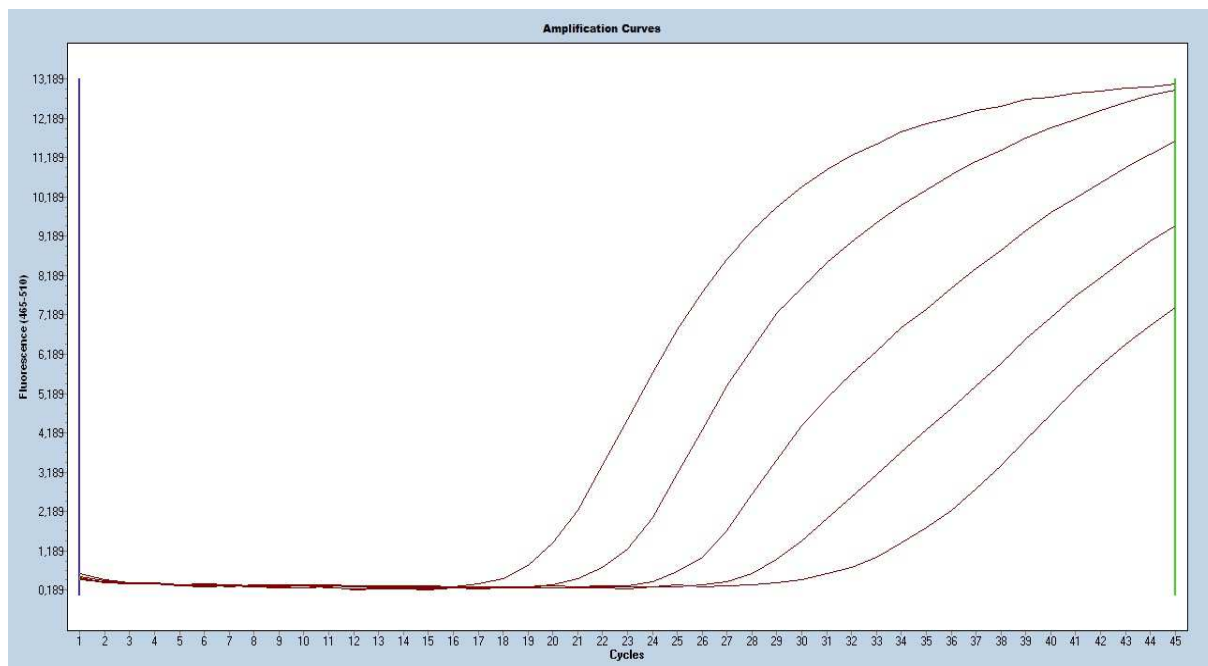


Fig. 4: Serie di diluizioni dei geni della tossina Shiga stx1/stx2 ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

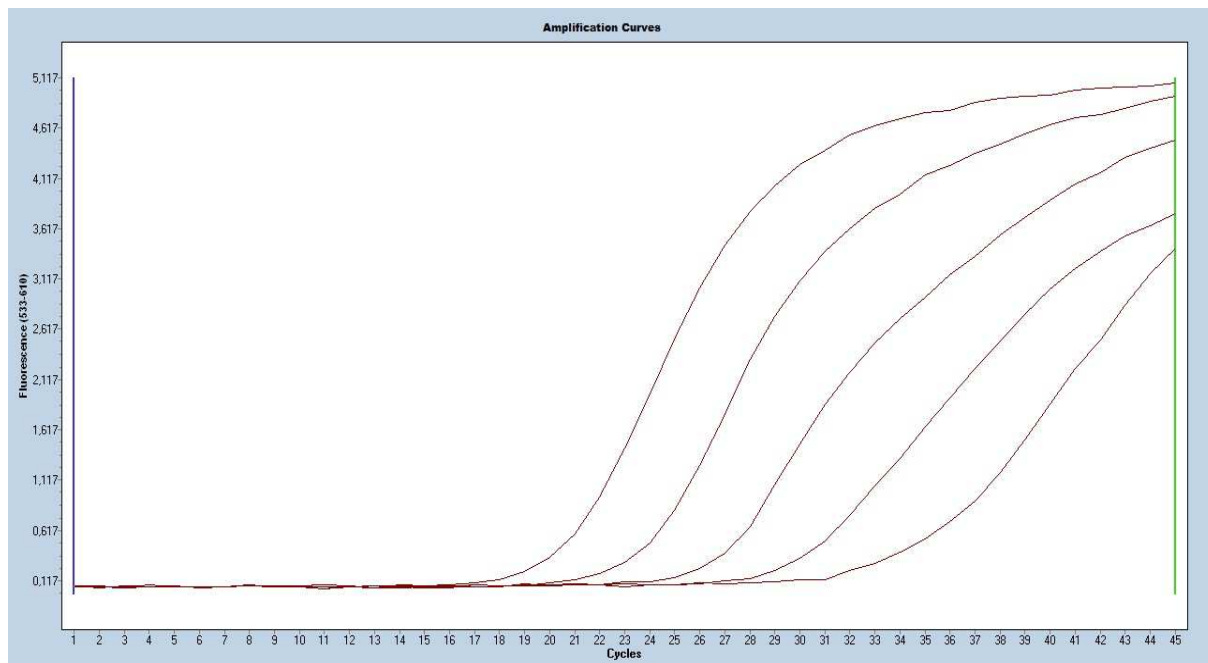


Fig. 5: Serie di diluizioni del gene ipaH ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

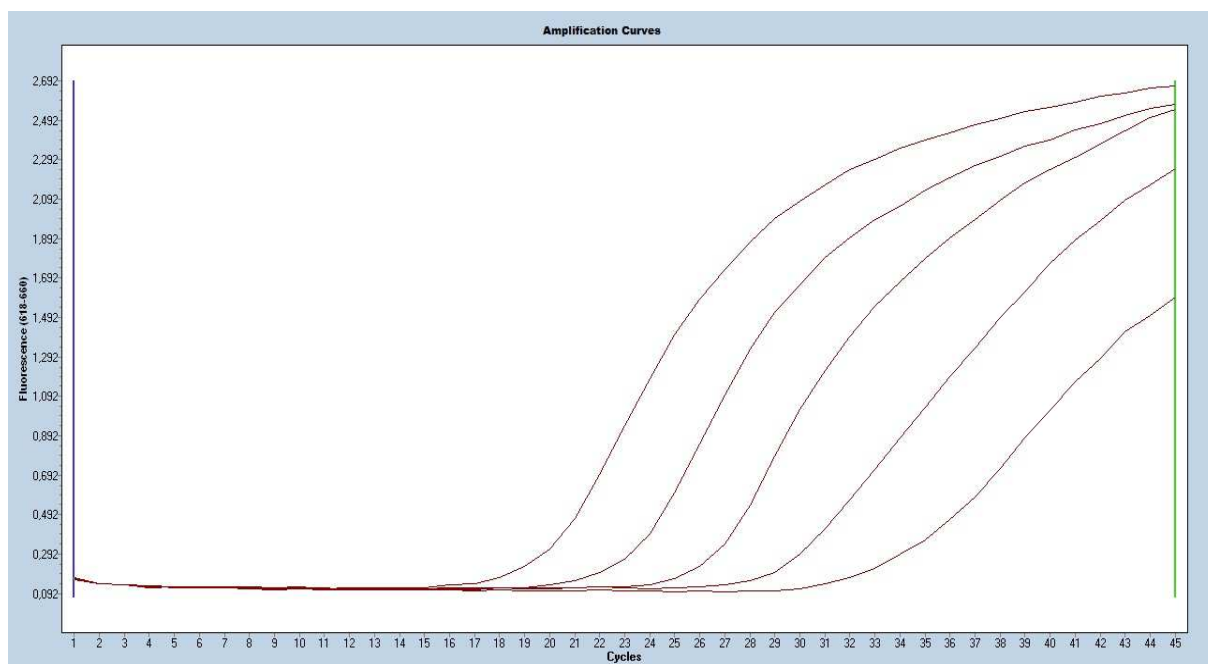


Fig. 6: Serie di diluizioni del gene eae ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

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

13.2 Specificità analitica

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

Tabella 12: Test di reattività crociata

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

13.3 Reattività analitica

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

Tabella 13: Test di reattività analitica










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

14. Cronologia delle versioni

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

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

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

Simboli specifici nel test

Non pertinente

16. Bibliografia

1. Müller D, *et al.* Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73 (10): 3380–3390.
2. Thiem VD, *et al.* Detection of Shigella by a PCR Assay Targeting the ipaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
3. Kaper JM, *et al.* PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:123-140.
4. Nataro JP and Kaper JM. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(1): 132-201.
5. Robert Koch Institut. Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). RKI-Ratgeber für Ärzte 2008.