

## DetECCIÓN DE ADN DE SEROGRUPOS DE *Escherichia coli* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

INFORME DE VALIDACIÓN

### ENSAYO

Detección de *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 y O145 mediante ensayo de PCR en tiempo real con nucleasa 5'.

### EQUIPOS VALIDADOS

Applied Biosystems, modelo 7500; Thermo Scientific, modelo PikoReal.

### MUESTRAS (N)

Enriquecimientos preparados a partir de muestras de alimentos adecuadas.

### ENSAYOS DE VALIDACIÓN

Inicio: 01/10/2013

Finalización: 01/05/2014

### ÁMBITO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO

La prueba está diseñada para detectar los genes asociados a los serogrupos O157, O111, O26, O103 y O145 mediante reacciones PCR en tiempo real con nucleasa 5'. Se analizó la eficacia del método conforme a la ISO 22118:2011 e ISO/TS 13136:2012, y este cumple los requisitos establecidos en estas Normas Internacionales.

El serotipado convencional es un método basado en reacciones de aglutinación anticuerpo-antígeno. Este es un método muy complejo y que lleva mucho tiempo. Recientemente, se han hallado métodos rápidos y sensibles como alternativas atractivas al método de serotipado convencional de *E. coli*. Estos métodos se basan en la PCR, en particular, en la PCR en tiempo real, que permiten la detección rápida de diferentes genes de antígenos, que, a su vez, permiten determinar los serogrupos de *E. coli*.

### BASE CIENTÍFICA

El presente método se basa en un ensayo de PCR en tiempo real con nucleasa 5' en el que se utilizan sondas fluorescentes específicas para detectar el ADN amplificado mediante la hibridación con amplicones. Estas sondas están conectadas a un fluoróforo en un extremo y, en el otro, a un apagador que suprime la fluorescencia. Si la secuencia diana está presente durante la PCR, se producirá la amplificación y la sonda se degradará, lo cual aumentará la fluorescencia. La fluorescencia se mide con un detector, y el software correspondiente dibuja la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos, por lo que permite determinar la presencia o la ausencia del organismo diana.

El método también incluye un control interno (IC) del ADN. Este control se amplifica al mismo tiempo que la secuencia de ADN de la diana, aunque utilizando un conjunto diferente de cebadores y una sonda etiquetada con un segundo fluoróforo. La inclusión del IC en cada reacción evita que haya falsos negativos, debido a la presencia de sustancias inhibitoras de la PCR, y valida los resultados negativos.

### MUESTRAS

En la validación de la presente prueba se utilizaron 5 muestras de alimentos enriquecidas según el método descrito en la norma ISO 16654:2001 y en 45 cepas de *Escherichia coli*. Tras el enriquecimiento, las colonias de STEC sospechosas se aislaron, volvieron a suspenderse en la solución de lisis y se les extrajo el ADN. Estas muestras de alimentos incluían 5 matrices diferentes, elegidas de manera aleatoria en comercios:

- Queso
- Leche
- Carne
- Carne procesada
- Tierra

## CARACTERÍSTICAS DE LA EFICACIA DEL MÉTODO

### 1. CONTROLES ANALÍTICOS

Cada conjunto de pruebas realizado simultáneamente con el presente método incluye los siguientes controles:

**Control positivo externo (PC):** reacción que contiene ADN de mostaza

**Control negativo (NC):** reacción sin ADN diana

Cada reacción individual incluye:

**Control interno de la amplificación (IC):** todas las reacciones incluyen un IC del ADN y el conjunto correspondiente de cebadores y sonda, etiquetados con un segundo fluoróforo. Este control se amplifica de forma simultánea, aunque independientemente de la secuencia de ADN diana. La inclusión del IC en cada reacción evita que haya falsos negativos, debido a la presencia de sustancias inhibitoras de la PCR, y valida los resultados negativos.

Para validar las pruebas, los controles deben mostrar los siguientes resultados:

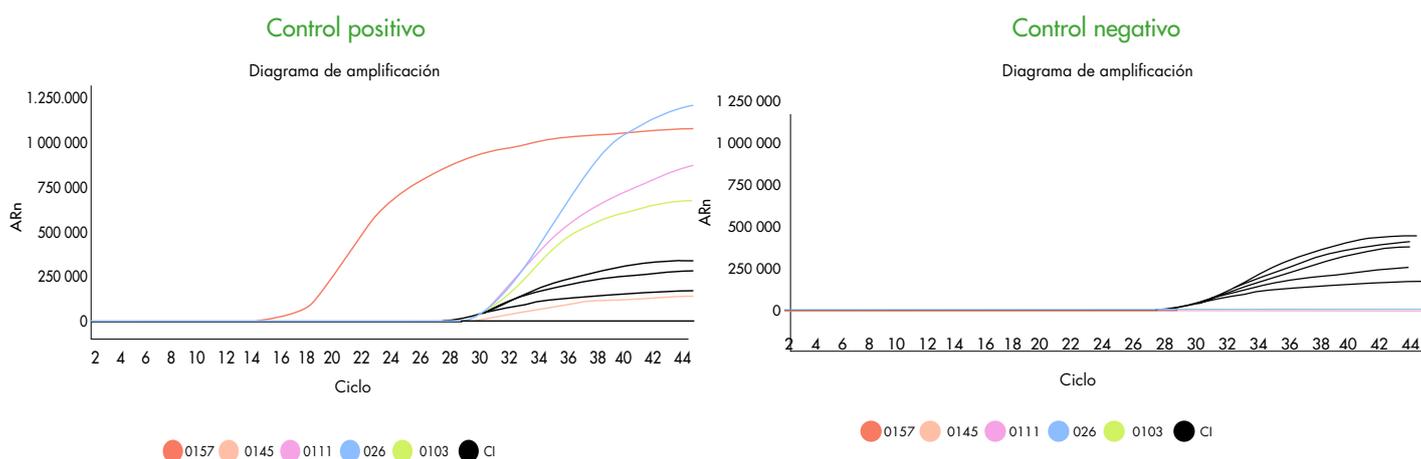
	Detección de la diana Canales 1	Detección de la diana Canal 2
Control negativo	Negativo	Positivo
Control positivo	Positivo	No es significativo

Si los controles no coinciden con estos resultados, el experimento debe repetirse.

Los resultados obtenidos mediante el presente método se interpretarán de la siguiente manera:

Detección de la diana Canales 1	Detección de la diana Canales 2	Interpretación
Positivo	No es significativo	Positivo
Ct = N/D	Positivo	Negativo
Ct = N/D	Ct = N/D	Inhibición**

\*\*Si la detección de la diana y del IC da negativo, esto indica la presencia de un inhibidor de la amplificación, y la muestra debe ser analizada nuevamente después de una dilución 1/10.



### 2. INSTRUMENTOS

Los instrumentos en tiempo real deben estar equipados con canales de detección FAM y ROX. No se necesitan requisitos especiales para los otros instrumentos necesarios (centrifugadora, bloque térmico y micropipetas).

El método se validó en un instrumento ABI 7500 (Applied Biosystems) y PikoReal (Thermo Scientific).

### 3. ESPECIFICIDAD

Para esta propuesta se utilizaron muestras preenriquecidas que eran positivas en O157, O26, O111, O103 y O145 de *Escherichia coli* y que fueron identificadas por un método acreditado. Se analizaron 5 muestras preenriquecidas (Tabla 3.1).

Código	Identificación de las cepas	Otros datos
E 2	<i>Queso enriquecido</i>	
E 112	<i>Leche enriquecida</i>	
E 218	<i>Carne procesada enriquecida</i>	
E 600	<i>Tierra enriquecida</i>	
E 662	<i>Carne enriquecida</i>	

Tabla 3.1: Lista de cepas de *Escherichia coli* utilizadas en la prueba de inclusividad

#### Resultado:

Todas las cepas se detectaron con el presente método, lo que equivale a una inclusividad del 100 %.

### 3.2. Prueba de exclusividad

Se seleccionaron las cepas de la prueba de exclusividad siguiendo las recomendaciones de la Norma Internacional ISO 22118:2011. Se analizó un total de 30 microorganismos no diana relacionados con el microorganismo diana o que se encuentran en el mismo hábitat y que podrían interferir en los resultados de las pruebas (Tabla 3.2). Se analizaron las cepas utilizando 10 ng de ADN genómico. Se confirmó la adecuación de los extractos de ADN para la amplificación del gen bacteriano 16S rRNA, utilizando cebadores universales. Se confirmó la identificación de todas las cepas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Todas las cepas fueron analizadas por triplicado.

Código	Identificación de las cepas	Otros datos
MB 385	<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 4031
MB 388	<i>Listeria monocytogenes</i>	Serotipo 1/2a o 3a
MB 381	<i>Listeria innocua</i>	CECT 910
MB 357	<i>Escherichia coli</i>	NCTC 9001
MB 372	<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	NCTC 11351
MB 373	<i>Campylobacter coli</i>	NCTC 11366
MB 399	<i>Salmonella Typhimurium</i>	CECT 443
MB 22	<i>Vibrio cholerae</i>	Aislado local
MB 356	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NCTC 10885
MB 363	<i>Bacillus cereus</i>	IFM1600
MB 115	<i>Citrobacter freundii</i>	Aislado local
MB 451	<i>Cronobacter muytjensii</i>	ATCC 51329
MB 141	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748 T
MB 144	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	CECT 4022T
MB 150	<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 6571
MB 302	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado local
MB 13	<i>Serratia marcescens</i>	Aislado local
MB 163	<i>Proteus vulgaris</i>	Aislado local
MB 365	<i>Enterococcus faecalis</i>	Aislado local
MB 306	<i>Enterococcus hirae</i>	Aislado local
MB 147	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Aislado local
MB 267	<i>Shigella flexneri</i>	Aislado local
MB 249	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Aislado local
MB 178	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aislado local
MB 449	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	ATCC 11509
MB 274	<i>Legionella pneumophila</i>	Aislado local
MB 278	<i>Legionella micdadei</i>	Aislado local
MB 362	<i>Clostridium perfringens</i>	Aislado local
MF 128	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT
MF 129	<i>Aspergillus niger</i>	Aislado local

Tabla 3.2: Lista de cepas utilizadas en la prueba de exclusividad

**Resultado:**

El método presentó el 100 % de exclusividad, ya que ninguna de las cepas mostró resultados positivos, y el resultado fue positivo.

**4. ROBUSTEZ**

Se determinó la robustez del presente método introduciendo variaciones experimentales y técnicas en los parámetros descritos en la Tabla 4.1, utilizando dos muestras positivas y dos negativas y realizadas por triplicado.

Parámetro	N.º de variaciones	Descripción
Temperatura de recocido	2	+2 °C; -2 °C.
Concentración de MgCl <sub>2</sub>	2	+0,5 mm; -0,5 mm
Ejecutor independiente		No aplicable
Diferentes equipos en tiempo real	2	ABI 7500 PikoReal, Thermo Scientific
Laboratorios independientes	1	Laboratorio de I+D Biopremier

Tabla 4.1: Parámetros del método sometidos a variaciones

**Resultado:**

Se obtuvieron resultados congruentes en todas las muestras y en todas las variantes de los parámetros analizados. Todas las muestras también presentaron los resultados esperados de las pruebas.

**5. VERACIDAD**

Se evaluó la veracidad del método utilizando 6 muestras de alimentos positivas y 11 negativas. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

**Resultado:**

Todas las muestras presentaron los resultados esperados de la prueba en todas las réplicas, lo que equivale a una veracidad del 100 %.

**Declaración de ejecución**

De acuerdo con las pruebas realizadas y los resultados indicativos obtenidos, se considera que la presente prueba permite lograr resultados adecuados conforme a los requisitos de Condalab y que la prueba queda validada.

La presente prueba permite la "Detección de los serogrupos de E. coli O157, O26, O111, O103 y O145 mediante PCR en tiempo real".



Laboratorios Conda S.A.  
C/ Forja, 9. Torrejón de Ardoz 28850 Madrid, España  
T. +34 91 761 02 00