

RIDA® UNITY EHEC/EPEC

REF UN2205



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

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



0123

1. Предназначение

За *in vitro* диагностична употреба. Тестът RIDA®UNITY EHEC/EPEC, извършен на платформа RIDA®UNITY, е мултиплексен PCR в реално време за директно качествено откриване на ДНК за фактори на вирулентност на EHEC, STEC, EPEC и EIEC/*Shigella* spp. в нетретирани проби от човешки изпражнения и проби от култури от хора с признаци и симптоми на остър гастроентерит. Тестът RIDA®UNITY EHEC/EPEC е предназначен за подкрепа на диференциална диагноза на инфекции с *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC и EIEC/*Shigella* spp.) при пациенти със симптоми на гастроентерит заедно с други клинични и лабораторни находки.

Отрицателните резултати не изключват инфекция с *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC или EIEC/*Shigella* spp.) и не трябва да се използват като единствена основа за диагноза.

Продуктът е предназначен за професионална употреба.

2. Резюме и обяснение на теста

Диарийните заболявания са значителен здравен проблем, причиняващи приблизително 1,7 милиарда случая годишно при деца по целия свят.⁽¹⁾ Според Световната здравна организация (СЗО) тези заболявания са втората водеща причина за смърт при деца на възраст под 5 години, особено в развиващите се страни, с приблизително 525 000 смъртни случая годишно.⁽¹⁾ Един от най-често срещаните бактериални патогени на диарийни заболявания е *Escherichia coli*.⁽²⁾ *E. coli* е грам-отрицателна, лактоза-ферментираща подвижна бактерия и принадлежи към семейството *Enterobacteriaceae*. Тя е нормален обитател на гастроинтестиналния тракт, но може също така да причини диарийни заболявания с висока морбидност и смъртност при деца, особено в развиващите се страни. Следните класове *E. coli*, генериращи диария, са идентифицирани на базата на характеристиките на вирулентност на бактерията, епидемиологията и клиничните прояви: ентеропатогенна *E. coli* (EPEC), ентеротоксигенна *E. coli* (ETEC), ентерохеморагична *E. coli* (EHEC), ентероинвазивна *E. coli* (EIEC) и ентероагрегативна *E. coli* (EAEC). Всички тези диария-генериращи патотипове на *E. coli* могат да се предават по фекално-орален път.⁽³⁾

Сред интестиналните патогенни *E. coli* ентерохеморагичната *E. coli* (EHEC) има особено значение. Това са подгрупа на Shiga токсина- или *E. coli*, произвеждаща веротоксин (съответно STEC и VTEC). Патогенността на STEC може да се проследи до способността им да колонизират червата чрез прилепване към чревните епителни клетки. След колонизация бактерията е в състояние да произвежда два цитотоксина, веротоксин 1 и 2. Поради сходството на веротоксините с Shiga токсина на *Shigella dysenteriae* VTEC също се наричат STEC. Други важни диагностични фактори за патогенността на EHEC са не само *stx1/stx2* (Shiga токсин гени), но също гена *eae*

(*E. Coli*-прикрепващ и ефейсиращ ген), който кодира интимин, мембрания протеин. Този мембранен протеин отговаря за прикрепването на патогена към чревните епителни клетки.⁽⁴⁾ Клиничните симптоми, които могат да се причинят от ЕНЕС/STEC при хора, варират от кървава диария до хемолитичен уремичен синдром (HUS).^(2, 5) Източниците на инфекция са основно контаминирани храни, където по-малко от 1000 бактерии са достатъчни да причинят инфекция с ЕНЕС/STEC. Най-лошата вълна, причинена от STEC в Германия до момента, е била през 2011 г. Тази вълна е довела до 3816 идентифицирани инфекции със STEC и 54 смъртни случая, от които 32 са свързани с HUS.⁽⁵⁾

За ентеропатогенните *E. coli* (EPEC) е известно, че причиняват диарийни заболявания при деца, особено в развиващите се страни.⁽³⁾ EPEC може да се разграничи от ЕНЕС по отсъствието на Shiga токсини.⁽³⁾ Най-честите симптоми, свързани с инфекция с EPEC, са водниста диария, коремни болки, гадене, повръщане и треска, а инфекциозната доза при здрави възрастни е около 10^8 организма.⁽⁵⁾

Ентероинвазивните *E. coli* (EIEC) и *Shigella* spp. по аналогичен начин причиняват диарийни заболявания в целия свят, особено в развиващите се страни. И двете са грам-отрицателни бактерии, които са биохимично и генетично близко свързани една с друга.⁽⁶⁾ Патогенността на EIEC и *Shigella* spp. се основава на плазмид-медираната инвазия в чревните епителни клетки и тяхното разрушаване. Продуктите на гена на инвазивния плазмиден антиген H (*ipaH*) са отговорни за този процес. Този ген е от значение за откриването на EIEC/*Shigella* spp. и следователно това позволява да се разграничи този патотип от ЕНЕС. За вълните от инфекции от EIEC/*Shigella* spp. се смята, че се причиняват основно от храна и се проявяват с диария, коремни болки, гадене и треска.⁽⁶⁾

3. Принцип на теста

RIDA®UNITY EHEC/EPEC е мултиплексен PCR в реално време за директно качествено откриване и диференциация на гени за фактори на вирулентност на EHEC, STEC, EPEC и EIEC/*Shigella* spp. в проби от човешки изпражнения или от култури.

Обработването е напълно автоматизирано със системата RIDA®UNITY. Първо, нуклеиновите киселини се екстрахират чрез използване на RIDA®UNITY Universal Extraction Kit и Internal Control Kit.

Целевата последователност се открива винаги в едноетапен формат RT-PCR в реално време (дори с ДНК анализи), тоест обратната транскрипция (RT) и последващата PCR се извършват в един реакционен флакон. В процеса изолираната РНК (ако е налична) се транскрибира в кДНК с помощта на обратна транскриптаза. Специфичните фрагментни от гени на факторите на вирулентност *stx1/stx2*, *eae* и *ipaH* след това се амплифицират чрез PCR в реално време.

Амплифицираните целеви последователности се откриват с помощта на хидролизни сонди, които са маркирани с туш в единия край и флуоресцентно репортерно багрило (флуорофор) в другия. Сондите хибридизират с ампликона в присъствието на целева последователност. По време на удължаването Taq polymerase разделя репортера от туша. Репортерът излъчва флуоресцентен сигнал, който се засича от оптичния блок на инструмента за PCR в реално време. Флуоресцентният сигнал се увеличава с количеството образувани ампликони. RIDA®UNITY Internal Control Kit трябва да се използва едновременно, за да може да се провери подготовката на пробата и/или потенциалното PCR инхибиране.

4. Предоставени реагенти

Реактивите в комплекта са достатъчни за 96 определяния*.

Таблица 1: Предоставени реагенти

Референтен номер	Реагент	Количество		Цвят на капака
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	жълт, готов за употреба
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	червен, готов за употреба
UNZ2205PC	Positive Control	1 ×	200 µL	син, готов за употреба
UNZ2205NC	Negative Control	1 ×	450 µL	бял, готов за употреба

*При многократна употреба и в по-малки серии броят на реакциите може да бъде намален.

5. Инструкции за съхранение

- Следвайте указанията за работа в таблица 2 и съхранявайте комплекта непосредствено след употреба в съответствие с посочената информация.
- Всички реагенти трябва да се съхраняват далеч от светлина при -16 °C до -28 °C и ако не са отворени, могат да се използват до срока на годност, отпечатан върху етикета. Гаранцията за качество вече не е валидна след изтичане на срока на годност.
- Всички реагенти трябва внимателно да се размразят преди употреба (напр. в хладилник при 2 - 8 °C).
- Повтарящото се замразяване и размразяване до 8 пъти не влияе на тестовите свойства.

Таблица 2: Условия и информация за съхранение

	Температура на съхранение	Максимален срок на съхранение
в неотворено състояние	-16 °C до -28 °C	Може да се използва до отпечатания срок на годност
в отворено състояние	-16 °C до -28 °C	8 цикъла на замразяване и размразяване

6. Необходими, но непредоставени реагенти

Тестът RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR е предназначен изключително за използване със системата RIDA®UNITY. Следните продукти са абсолютно необходими за правилна употреба:

6.1 Реагенти

Следните реагенти са необходими за извършване на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC:

Реагенти	Номер на елемент
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Лабораторно оборудване

Следното оборудване е необходимо за извършване на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC:

Оборудване
Система RIDA®UNITY; номер на част: ZUNITY (R-Biopharm AG)
RIDA®UNITY консумативи (връхчета, плаки, реакционни флакони, покрития). Вижте инструкциите за употреба за системата RIDA®UNITY, информация за поръчване на консумативи.
Вортекс
Настолна центрофуга
Ръкавици за еднократна употреба без пудра
Външен циклер (възможно подобрение на системата)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Комплектът RIDA®UNITY EHEC/EPEC може да се използва заедно с други съвместими циклери. Алтернативните PCR инструменти в реално време трябва да бъдат проверени/потвърдени от потребителя. Свържете се с R-Biopharm AG на pcr@r-biopharm.de, за да проверите съвместимостта.

7. Предупреждения и предпазни мерки за потребителите

За *in vitro* диагностична употреба.

Този тест трябва да се извършва само от квалифициран лабораторен персонал.

Трябва да се спазват указанията за работа в медицински лаборатории.

Винаги се придържайте стриктно към ръководството за експлоатация, когато извършвате този тест.

Не пипетирайте проби или реагенти с устата си. Избягвайте контакт с наранена кожа и лигавици.

Носете лични предпазни средства (подходящи ръкавици, лабораторна престилка, предпазни очила), когато боравите с реагенти и проби, и измивайте ръцете си след завършване на теста.

Не пушете, не се хранете и не пийте течности в зони, където се обработват проби.

Избягвайте контаминирането на пробите и компонентите на комплекта с микроби и нуклеази (ДНКаза / РНКаза).

Клиничните проби трябва да се разглеждат като потенциално инфекциозни и трябва да се изхвърлят по подходящ начин, както всички реагенти и материали, които влизат в контакт с потенциално инфекциозни проби.

Не разменяйте и не смесвайте компонентите (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) от една партида на комплект с компонентите на друга партида.

Тестовият комплект може да се използва за 8 седмици след първоначалното отваряне (комплектът може да се презарежда до 6 пъти). Не използвайте тестовия комплект след изтичане на срока на годност. Тези спецификации също се проверяват от системата RIDA®UNITY.

Потребителите са отговорни за правилното изхвърляне на всички реагенти и материали след употреба. За изхвърляне спазвайте националните разпоредби.

Допълнителни подробности за информационния лист за безопасност (Safety Data Sheet, SDS) можете да намерите под номера на елемента на адрес <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

За потребители в Европейския съюз: докладвайте всички сериозни нежелани събития, свързани с продукта, на R-Biopharm AG и подходящите национални органи.

Резюмето във връзка с безопасността и действието (SSP) за този продукт ще бъде достъпно на <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, след като бъде включен в Европейската база данни за медицински изделия (EUDAMED). В базата данни потърсете изделието, като използвате UDI-DI, разположен на външната опаковка на изделието.

8. Вземане и съхранение на проби

Препоръчително е да се използва пресен материал за проба, за да се постигне възможно най-доброто представяне на анализа RIDA®UNITY EHEC/EPEC.

Избягвайте многократно замразяване и размразяване на пробата.

Не събирайте проби от изпражнения в транспортни контейнери, които съдържат транспортна среда с консерванти, животински серуми, метални йони, окислителни агенти или детергенти, тъй като такива вещества може да интерферират с теста RIDA®UNITY.

Препоръчва се да се произвеждат аликвотни части от материалите за изследване, за да се избегне многократно размразяване и замразяване. Замразените проби трябва да се размразяват непосредствено преди екстракцията, за да се предотврати разграждането на нуклеиновите киселини.

Следвайте инструкциите за съхранение на проби в таблици 3 до 6.

Таблица 3: Съхранение на пробите - откриване на EHEC

Нативни проби - изпражнение		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 дни	≤ 7 дни	≤ 6 месеца

Нативни проби - култура		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 ден	≤ 1 ден	-

В елуат (от изпражнения или култура)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 часа	≤ 36 часа	≤ 7 дни

При температура на съхранение -20 °C / -80 °C многократното замразяване / размразяване на пробата от изпражнения до 5 пъти не оказва влияние върху свойствата на теста.

При температура на съхранение -20 °C многократното замразяване / размразяване на елуата (от изпражнения или култура) до 3 пъти не оказва влияние върху свойствата на теста.

Не развивайте култури от преди това замразени изпражнения, защото замразяването значително повлиява растежните характеристики на патогените и това може потенциално да причини фалшиво отрицателни резултати.

Таблица 4: Съхранение на пробите - откриване на STEC

Нативни проби - изпражнение		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 дни	≤ 7 дни	≤ 6 месеца

Нативни проби - култура		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 ден	≤ 1 ден	-

В елуат (от изпражнения или култура)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 часа	≤ 36 часа	≤ 7 дни

При температура на съхранение -20 °C / -80 °C многократното замразяване / размразяване на пробата от изпражнения до 5 пъти не оказва влияние върху свойствата на теста.

При температура на съхранение -20 °C многократното замразяване / размразяване на елуата (от изпражнения или култура) до 3 пъти не оказва влияние върху свойствата на теста.

Не развивайте култури от преди това замразени изпражнения, защото замразяването значително повлиява растежните характеристики на патогените и това може потенциално да причини фалшиво отрицателни резултати.

Таблица 5: Съхранение на пробите - откриване на EPEC

Нативни проби - изпражнение		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 дни	≤ 7 дни	≤ 6 месеца

Нативни проби - култура		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 ден	≤ 1 ден	-

В елуат (от изпражнения или култура)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 часа	≤ 36 часа	≤ 7 дни

При температура на съхранение -20 °C / -80 °C многократното замразяване / размразяване на пробата от изпражнения до 5 пъти не оказва влияние върху свойствата на теста.

При температура на съхранение -20 °C многократното замразяване / размразяване на елуата (от изпражнения или култура) до 3 пъти не оказва влияние върху свойствата на теста.

Не развивайте култури от преди това замразени изпражнения, защото замразяването значително повлиява растежните характеристики на патогените и това може потенциално да причини фалшиво отрицателни резултати.

Таблица 6: Съхранение на пробите - откриване на EIEC/ *Shigella* spp.

Нативни проби - изпражнение		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 ден	≤ 7 дни	≤ 6 месеца

Нативна проба - култура		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 1 ден	-

В елуат (от изпражнения или култура)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 часа	≤ 36 часа	≤ 7 дни

При температура на съхранение -20 °C / -80 °C многократното замразяване / размразяване на пробата от изпражнения до 5 пъти не оказва влияние върху свойствата на теста.

При температура на съхранение -20 °C многократното замразяване / размразяване на елуата (от изпражнения или култура) до 3 пъти не оказва влияние върху свойствата на теста.

Не развивайте култури от преди това замразени изпражнения, защото замразяването значително повлиява растежните характеристики на патогените и това може потенциално да причини фалшиво отрицателни резултати.

8.1 Подготовка на ДНК от проби от изпражнения и от култура

За да изолирате ДНК от проби от изпражнения и от култура, използвайте RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Следвайте правилните процедури в инструкциите за употреба за RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (раздел: Приготвяне на нуклеинови киселини от проби от изпражнения; раздел: Приготвяне на нуклеинови киселини от проби от култура).

9. Тестова процедура

Поставете както пробите, така и реагентите RIDA®UNITY EHEC/EPEC на системата RIDA®UNITY в началото на употребата.

Преди това смесете подходящо **Reaction Mix**, **Negative Control** и **Positive Control** чрез използване на вортекс. Не вортексирайте **Enzyme Mix**.

След това за кратко центрофугирайте всички компоненти.

PCR епруветките за пробите, които трябва да бъдат изследвани, трябва да бъдат поставени предварително във вградения PCR циклер.

Предлагат се носачи за правилно зареждане на системата с реагенти и консумативи. За процеса за зареждане следвайте инструкциите на системата RIDA®UNITY. Спазвайте съответните раздели в ръководството на системата RIDA®UNITY (раздел: Провеждане на изпълняване).

Тестът RIDA®UNITY EHEC/EPEC може да се използва само в комбинация с RIDA®UNITY Internal Control Kit. Това позволява ранно разпознаване на потенциално PCR инхибиране, проверка на целостта на реагента и потвърждаване на успешната екстракция на нуклеинови киселини. Процедурата е описана в инструкциите за употреба на RIDA®UNITY Internal Control Kit (раздел: Тестова процедура).

Автоматизираното обработване е описано в ръководството на системата RIDA®UNITY (раздел: Провеждане на изпълняване).

9.1 Настройки на изделието

9.1.1 Универсален профил на PCR в реално време

За да се хармонизират анализите RIDA®UNITY, анализът RIDA®UNITY ЕНЕС/ЕРЕС е потвърден изключително в универсалния профил. Това прави възможно комбинирането на ДНК и РНК анализи едни с други. Най-общо казано, обратната транскрипция следователно е на първо място в универсалния профил.

Таблица 7: Универсален профил за PCR в реално време за RIDA®UNITY

Обратна транскрипция	10 min, 58 °C
Първоначална денатурация	1 min, 95 °C
Цикли	45 цикъла
PCR Денатурация	10 секунди, 95 °C
Рекомбиниране / удължаване	15 секунди, 60 °C
Скорост на преход на температура / скорост на нарастване	Максимално

Забележка: Рекомбинирането и удължаването се извършват в една и съща стъпка.

Таблица 8: Универсален профил на PCR в реално време за CFX96™ Dx

Обратна транскрипция	10 min, 58 °C
Първоначална денатурация	1 min, 95 °C
Цикли	45 цикъла
PCR Денатурация	15 секунди, 95 °C
Рекомбиниране / удължаване	30 секунди, 60 °C
Скорост на преход на температура / скорост на нарастване	Максимално

Забележка: Рекомбинирането и удължаването се извършват в една и съща стъпка.

9.2 Настройка на канал за откриване

Таблица 9: Избор на подходящи канали за откриване

Инструмент за PCR в реално време	Откриване	Канал за откриване	Забележка
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK channel stx
	Internal Control	HEX	SEEK channel ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK channel ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK channel eae
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK channel stx
	Internal Control	VIC	SEEK channel ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK channel ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK channel eae

10. Контрол на качеството - индикация за нестабилност или изтичане на срока на годност на реактивите

Пробите са оценени чрез използване на аналитичния софтуер RIDA®SEEK на системата RIDA®UNITY. **Negative Control** и **Positive Control** трябва да показват правилните резултати (вижте табл. 9).

Positive Control е налична в концентрация от 10^3 копия/ μ L. Използва се в общо количество 5×10^3 копия при всяко изпълняване на PCR.

Negative Control вече съдържа RIDA®UNITY Internal Control. Тъй като контролите не съдържат шаблон, не трябва да се очакват сигнали в целевите канали. Положителните сигнали в IC канала, с които се открива вътрешната контрола, са от съществено значение (вижте табл. 10).

Табл.10: Валидно изпълняване на PCR трябва да отговаря на следните условия:

Проба	Резултат	IC Ct	Целеви ген Ct
Положителна контрола	+	непр. *	Вижте Certificate of Analysis
Отрицателна контрола	-	Ct > 20	0

*При определени обстоятелства IC каналът може да има положителен сигнал в положителната контрола и следователно не трябва да се оценява.

Ако положителната контрола не е в рамките на посочения диапазон на Ct, но отрицателната контрола е валидна, всички реакции, включително контролите, трябва да бъдат повторно анализирани в PCR.

Ако отрицателната контрола не е отрицателна, но положителната контрола е валидна, всички реакции, включително контролите, трябва да се анализират повторно в PCR.

Ако посочените стойности не са покрити, проверете следните елементи, преди да повторите теста:

- Срок на годност на използваните реагенти
- Функционалност на използваното оборудване
- Правилна тестова процедура

Ако условията все още не са изпълнени след повтаряне на теста, консултирайте се с производителя или с вашия местен дистрибутор на R-Biopharm.

11. Оценка и интерпретация

Оценяването и интерпретацията на пробите се прави чрез използване на аналитичния софтуер на системата RIDA®UNITY - RIDA®SEEK.

Към момента няма международно признат референтен метод или референтен материал за стандартизация. Контролните материали са метрологично проследими до вътрешните стандарти на R-Biopharm AG, базирани на специфични ДНК ампликони.

За допълнителна информация относно метрологичната проследимост се свържете с R-Biopharm AG.

Определените стойности, диапазоните и допълнителни подробности могат да бъдат намерени в сертификата за анализ (Certificate of Analysis, CoA).

Табл.11: Интерпретация на резултатите*

Откриване на				
<i>stx1/stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	IC	Резултат
+	-	-	+ / -	Откриваеми STEC (EHEC)
-	+	-	+ / -	Откриваеми EIEC/ <i>Shigella</i> spp.
-	-	+	+ / -	Откриваеми EPEC
+	+	-	+ / -	Откриваеми STEC (EHEC) и EIEC/ <i>Shigella</i> spp.
+	-	+	+ / -	Откриваеми EHEC
-	+	+	+ / -	Откриваеми EIEC/ <i>Shigella</i> spp. и EPEC
+	+	+	+ / -	Откриваеми EHEC и EIEC/ <i>Shigella</i> spp.
-	-	-	+	Целеви гени не може да бъдат открити
-	-	-	-	Невалидно

*+= положително

- = отрицателно

Законът за защита от инфекции (IfSG) описва EHEC като Shiga токсин-произвеждаща *E. coli* (STEC), които са патогени при хората. Тъй като за момента не може да се установи точна дефиниция на човешки патогенен STEC, се смята, че **всеки** STEC е потенциален EHEC.⁽⁵⁾

Пробата е положителна, ако ДНК на пробата и Internal Control показват сигнал за амплификация в системата за откриване.

Проба е също положителна, ако ДНК на пробата показва сигнал за амплификация, но не може да се види сигнал за амплификация за **Internal Control** в системата за откриване. Откриването на **Internal Control** в този случай не е необходимо, тъй като високите концентрации на ампликони могат да доведат до слаб или липсващ сигнал на **Internal Control**.

Пробата е отрицателна, ако ДНК на пробата не показва сигнал за амплификация, но може да се види сигнал за амплификация за **Internal Control** в системата за откриване. Инхибирането на PCR реакцията и предходната екстракция може да се изключи чрез откриването на **Internal Control**.

Пробата е невалидна, ако ДНК на пробата и **Internal Control** не показват сигнал за амплификация в системата за откриване. Има инхибитори в пробата или е възникнала грешка по време на процеса на екстракция.

12. Ограничения на метода

1. Тестът RIDA®UNITY EHEC/EPEC открива ДНК за фактори на вирулентност на EHEC, STEC, EPEC и EIEC/*Shigella* spp. при нетретирани проби от човешки изпражнения и култури. От това не може да се изведе връзка между нивото на определената стойност на Ct и появата на тежки клинични симптоми. Получените резултати винаги трябва да се интерпретират в комбинация с пълната клинична симптоматика.
2. Диагнозата не трябва да се основава само на резултата от молекулярно-биологичния анализ, а винаги трябва да взема предвид медицинската анамнеза и симптомите на пациента.
3. Този тест е одобрен само за автоматизирано обработване с помощта на системата RIDA®UNITY.
4. Този тест е потвърден само за проби от изпражнения и култури.
5. При използване на матрица за култури не прехвърляйте средата агар в PCR реакцията, защото това може да доведе до потенциална интерференция.
6. Неправилното вземане на проба, транспортиране, съхранение и боравене или патогенен товар под аналитичната чувствителност на теста може да доведе до фалшиво отрицателни резултати.
7. Наличието на PCR инхибитори може да доведе до фалшиво отрицателни или невалидни резултати.
8. Както при всички основани на PCR *in vitro* диагностични тестове, могат да бъдат открити изключително ниски концентрации на целевите последователности, които са под границата на откриване (LoD 95 %). Получените резултати невинаги са възпроизводими.
9. Мутациите или полиморфизмите в местата на свързване на праймера или сондата могат да попречат на откриването на нови или неизвестни варианти и могат да доведат до фалшиво отрицателни резултати при използване на RIDA®UNITY EHEC/EPEC.
10. Положителният резултат от теста не означава непременно наличието на жизнеспособни организми. Положителен резултат посочва, че целевите гени (EHEC, *stx1/2*, *eae*; STEC, *stx1/2*; EPEC, *eae*; о EIEC/*Shigella* spp., *ipaH*) са налични.
11. Този анализ трябва да се извършва в съответствие с регулациите за добра лабораторна практика (GLP). Потребителите трябва точно да следват инструкциите на производителя, когато извършват теста.

13. Характеристики на производителността

13.1 Характеристики на клиничната производителност

RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR е сравнен във външна лаборатория с CE-маркиран референтен тест на базата на 276 проби от изпражнения от пациенти със симптоми на гастроинтестинална инфекция.

Резултатите показват много висока чувствителност и специфичност за откриване на фактори на вирулентност на EHEC, STEC, EPEC и EIEC/*Shigella* spp. при употреба на комплекта RIDA®UNITY EHEC/EPEC.

Таблица 12: Откриване на *stx1/2* - проби от изпражнения

		Референтен PCR		Общо
		Положително	Отрицателно	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>stx1/2</i>	Положително	122	0	122
	Отрицателно	5	149	154
	Общо	127	149	276

Относителна чувствителност (95 % CI)	96,1 % (91,1 % - 98,7 %)
Относителна специфичност (95 % CI)	100 % (97,6 % - 100 %)

Таблица 13: Откриване на *ipaH* - проби от изпражнения

		Референтен PCR		Общо
		Положително	Отрицателно	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>ipaH</i>	Положително	65	0	65
	Отрицателно	0	211	211
	Общо	65	211	276

Относителна чувствителност (95 % CI)	100 % (94,5 % - 100 %)
Относителна специфичност (95 % CI)	100 % (98,3 % - 100 %)

Таблица 14: Откриване на *eae* - проби от изпражнения

		Референтен PCR		Общо
		Положително	Отрицателно	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>eae</i>	Положително	179	0	179
	Отрицателно	4	93	97
	Общо	183	93	276

Относителна чувствителност (95 % CI)	97,8 % (94,5 % - 100 %)
Относителна специфичност (95 % CI)	100 % (96,1 % - 100 %)

13.2 Характеристики на аналитичната производителност

13.2.1 Граница на откриване (LoD 95 %)

Положителна контролна проба (отрицателни проби от изпражнения, с добавка или с използване на проба от култура) се измерва в пет стъпки на разреждане (на стъпки от 0,25 log) за всяка цел с 20 повторения на стъпка в една партида, за да се определи LoD. Това беше последвано от пробит анализ. След това изчислената LoD беше потвърдена с 20 повторения на цел за изчислената стъпка / концентрация на разреждане.

За тестване са използвани следните щамове:

- *stx1/stx2: Escherichia coli* D3509 (LoD за *stx2* е определено, защото *stx2* се свързва с хемолитичен уремичен синдром.)
- *ipaH: Escherichia coli* Fr1368
- *eae: Escherichia coli* DSM8695

За откриване на ДНК на EHEC, STEC, EPEC и EIEC/*Shigella* spp. чрез RIDA®UNITY EHEC/EPEC анализ на системата UNITY са определени следните граници на откриване (LoD).

Резултатите от тези измервания са показани в таблица 15.

Таблица 15: Резултати от границите на откриване на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC за целите *stx1/2*, *ipaH* и *eae*.

	Матрица	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Изпражнения	476 000 CFU/mL	5300 CFU/mL	125 000 CFU/mL
	Култура	2130 CFU/mL	798 CFU/mL	2890 CFU/mL

*CFU: Colony Forming Units

LoD за *stx1/2* в проби от изпражнения е определена на 476 000 CFU/mL.

LoD за *ipaH* в проби от изпражнения е определена на 5300 CFU/mL.

LoD за *eae* в проби от изпражнения е определена на 125 000 CFU/mL.

LoD за *stx1/2* в проби от култура е определена на 2130 CFU/mL.

LoD за *ipaH* в проби от култура е определена на 798 CFU/mL.

LoD за *eae* в проби от култура е определена на 2890 CFU/mL.

За разширения работен процес чрез CFX96™ Dx тези стойности за LoD са потвърдени при предположението, че оставаме в 2-3-кратен диапазон на LoD.

13.2.2 Аналитична специфичност

Интерфериращи вещества

Наличието на PCR инхибитори и интерфериращи вещества може да доведе до фалшиво отрицателни или невалидни резултати. Поради това са изследвани ефектите на различни вещества, които могат да съществуват предвид широкото им използване за стомашно-чревни инфекции или широко разпространение в съответните материали за изследване.

Веществата, които биха могли да повлияят значително на резултатите от теста, са били изследвани първоначално при високи концентрации (тройна дневна доза или симулация на най-лошия случай) в екран за интерференция.

Не е установена интерференция за веществата, изброени в таблица 16.

Таблица 16: Потенциално интерфериращи вещества

Потенциално интерфериращо вещество	Концентрация
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg филмирани таблетки (азитромицин)	0,75% [w/v]
Бариев сулфат	18,5 % [v/v]
Cologran® течен подсладител (захарин + цикламат)	1,3 % [w/v]
Човешка кръв	5 % [v/v]
Таблетки с въглен 250 mg (въглен)	6 % [w/v]
Loperamide-ratiopharm® akut (лоперамид)	0,02 % [v/v]
Муцини	5 % [w/v]
Стеаринова / палмитинова киселина	40 % [w/v]

Кръстосани реакции

Изследвани са различни организми (бактерии, паразити, гъбички и вируси), които често могат да бъдат открити в матрицата на изпражненията.

Микроорганизмите, които трябва да бъдат изследвани за този анализ, са избрани, защото или те естествено се срещат в проби от изпражнения, или причиняват съответните симптоми като стомашно-чревни патогени. За анализ са използвани бактериални култури (между 10^6 и 10^9 CFU/mL), гъбични или вирусни култури, супернатанти от вирусни култури, изолати и LGC стандарти на съответните организми.

RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR е специфичен за EHEC, STEC, EPEC и EIEC/*Shigella* spp. Не са установени кръстосани реакции със следните видове (вижте табл. 17):

Таблица 17: Потенциално кръстосано реактивни организми.

Организъм	Резултат от теста*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adenovirus 40	-	-	-
Adenovirus 41, човешки, щам Так	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
Astrovirus 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	-

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

* - = отрицателно

** *Giardia intestinalis* и *Giardia lamblia* са един и същи организъм.

13.2.3 Прецизност

Прецизността на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR беше определена за следните нива на внимание.

Вътреанализна прецизност: Определяне на 5 контролни проби с използване на 20 повторения, всяка на RIDA®UNITY при идентични условия.

Междуанализна прецизност: определяне на 5 контролни проби в 20 изпълнения в два екземпляра за 10 работни дни (2 изпълнения на ден), извършено от различни техници при възпроизводими условия.

тестването за *вътре-* и *междуанализната* прецизност беше извършено с помощта на три различни партии.

Коефициентите на вариация, получени за всяко измерване чрез теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR на RIDA®UNITY и CFX96™ Dx са били 4,29 %.

Таблица 18: Резултати от прецизността на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC за *stx1/2* от проби от изпражнения (система RIDA®UNITY).

Ct средна стойност / CV	Вътреаналитична			Междуаналитична			Междупартидна	
	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партиди на комплект 1-3	
1	Ct	27,8	27,7	27,4	27,8	27,7	27,6	27,7
	CV (%)	1,02 %	1,19 %	1,11 %	3,25 %	3,19 %	3,18 %	3,21 %
2	Ct	29,6	29,5	29,2	30,0	29,8	29,8	29,8
	CV (%)	1,07 %	0,87 %	0,85 %	2,93 %	2,66 %	2,53 %	2,71 %
3	Ct	29,2	29,0	28,9	30,2	30,0	30,1	30,1
	CV (%)	1,72 %	1,35 %	1,46 %	3,29 %	2,85 %	3,15 %	3,10 %
4	Ct	-	-	-	32,0	31,7	31,6	31,8
	CV (%)	непр.	непр.	непр.	2,15 %	2,23 %	2,26 %	2,28 %
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	CV (%)	2,34 %	2,05 %	2,13	непр.	непр.	непр.	непр.

Таблица 19: Резултати от прецизността на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC за *stx1/2* от проби от изпражнения (CFX96™ Dx).

Ct средна стойност / CV	Вътреаналитична			Междуаналитична			Междупа ртидна	
	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партиди на комплект 1-3	
1	Ct	27,2	27,1	26,9	26,1	26,0	26,0	26,0
	CV (%)	0,82 %	1,04 %	0,76 %	3,12 %	2,61 %	2,64 %	2,80 %
2	Ct	27,6	27,2	27,1	28,1	27,5	27,5	27,7
	CV (%)	1,91 %	0,95 %	0,71 %	4,03 %	3,02 %	2,86 %	3,50 %
3	Ct	27,7	27,2	27,2	28,1	27,7	27,6	27,8
	CV (%)	2,34 %	0,74 %	0,95 %	4,29 %	3,11 %	2,91 %	3,54 %
4	Ct	-	-	-	29,2	28,7	28,6	28,9
	CV (%)	непр.	непр.	непр.	2,96 %	2,90 %	2,76 %	3,04 %
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	CV (%)	1,52 %	1,59 %	3,43 %	непр.	непр.	непр.	непр.

Таблица 20: Резултати от прецизността на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC за *ipaH* от проби от изпражнения (система RIDA®UNITY).

Ct средна стойност / CV	Вътреаналитична			Междуаналитична			Междупа ртидна	
	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партиди на комплект 1-3	
1	Ct	25,0	24,8	24,6	25,3	25,1	25,1	25,2
	CV (%)	1,02 %	1,11 %	1,09 %	1,84 %	1,73 %	1,83	1,80 %
2	Ct	26,2	26,1	26,0	26,3	26,1	26,2	26,2
	CV (%)	0,81 %	0,89 %	0,90 %	1,49 %	1,39 %	1,37 %	1,40 %
3	Ct	25,5	25,3	25,4	26,2	26,1	26,1	26,1
	CV (%)	0,96 %	0,99 %	0,87 %	1,72 %	1,57 %	1,53 %	1,61 %
4	Ct	-	-	-	27,1	27,0	27,0	27,0
	CV (%)	непр.	непр.	непр.	1,44 %	1,34 %	1,45 %	1,42 %
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	CV (%)	0,88 %	0,77 %	0,69 %	непр.	непр.	непр.	непр.

Таблица 21: Резултати от прецизността на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC за *iraH* от проби от изпражнения (CFX96™ Dx).

Ct средна стойност / CV	Вътреаналитична			Междуаналитична			Междупа ртидна	
	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партиди на комплект 1-3	
1	Ct	25,1	25,0	24,8	24,4	24,4	24,4	24,4
	CV (%)	1,15 %	1,25 %	1,06 %	1,49 %	1,79 %	1,70 %	1,67 %
2	Ct	25,2	25,2	25,2	25,4	25,3	25,4	25,4
	CV (%)	0,85 %	1,03 %	1,01 %	1,11 %	1,21 %	1,21 %	1,17 %
3	Ct	25,2	25,0	25,0	25,4	25,4	25,3	25,4
	CV (%)	1,04 %	1,09 %	1,14 %	1,29 %	1,46 %	1,53 %	1,43 %
4	Ct	-	-	-	26,2	26,1	26,1	26,2
	CV (%)	непр.	непр.	непр.	1,27 %	1,45 %	1,36 %	1,36 %
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	CV (%)	0,89 %	0,53 %	0,70 %	непр.	непр.	непр.	непр.

Таблица 22: Резултати от прецизността на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC за еае от проби от изпражнения (система RIDA®UNITY).

Ct средна стойност / CV	Вътреаналитична			Междуаналитична			Междупа ртидна	
	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партиди на комплект 1-3	
1	Ct	26,2	26,3	26,0	26,4	26,5	26,5	26,5
	CV (%)	0,93 %	0,86 %	0,85 %	1,92 %	1,95 %	2,03 %	1,97 %
2	Ct	27,7	27,9	27,7	27,9	28,0	28,0	27,9
	CV (%)	0,86 %	0,92 %	0,77 %	1,85 %	1,76 %	1,75 %	1,78 %
3	Ct	27,0	27,0	27,2	27,8	27,9	27,9	27,9
	CV (%)	1,05 %	0,86 %	0,99 %	2,03 %	1,84 %	1,80 %	1,89 %
4	Ct	-	-	-	28,9	29,1	29,1	29,0
	CV (%)	непр.	непр.	непр.	1,81 %	1,78 %	1,81 %	1,80 %
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	CV (%)	1,24 %	0,78 %	1,18 %	непр.	непр.	непр.	непр.

Таблица 23: Резултати от прецизността на теста RIDA®UNITY EHEC/EPEC за еае от проби от изпражнения (CFX96™ Dx).

Ct средна стойност / CV	Вътреаналитична			Междуаналитична			Междупа ртидна	
	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партида на комплект 1	Партида на комплект 2	Партида на комплект 3	Партиди на комплект 1-3	
1	Ct	26,5	26,6	26,5	26,3	26,4	26,4	26,4
	CV (%)	0,54 %	0,69 %	0,58 %	1,76 %	1,86 %	1,88 %	1,84 %
2	Ct	27,3	27,5	27,5	27,6	27,7	27,8	27,7
	CV (%)	0,68 %	0,68 %	0,65 %	1,49 %	1,70 %	1,51 %	1,59 %
3	Ct	27,3	27,4	27,4	27,6	27,8	27,8	27,7
	CV (%)	0,88 %	0,74 %	0,79 %	1,66 %	1,78 %	1,85 %	1,77 %
4	Ct	-	-	-	28,5	28,7	28,6	28,6
	CV (%)	непр.	непр.	непр.	1,32 %	1,58 %	1,48 %	1,47 %
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	CV (%)	0,73 %	0,55 %	0,68 %	непр.	непр.	непр.	непр.

13.2.4 Аналитична реактивност

Реактивността на RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR е тествана на зададен панел от щамове *E. coli* и *Shigella* (вижте табл. 24).

Таблица 24: Тестване на аналитична реактивност

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

*+ = положителен (поне 2 от 3 положителни повторения)










- = отрицателно

14. История на версиите


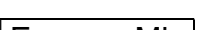

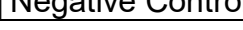
Номер на версията	Раздел и задание
2022-06-14	Версия на изданието

15. Пояснение на символите

Общи символи

	За <i>in vitro</i> диагностична употреба
	Спазвайте инструкциите за употреба
	Партиден номер
	Да се използва преди
	Температура на съхранение
	Номер на елемент
	Брой тестове
	Дата на производство
	Производител

Специфични за теста символи

	Реакционна смес
	Ензимна смес
	Отрицателна контрола
	Положителна контрола

16. Источници

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