

## RIDA® UNITY EHEC/EPEC

**REF** UN2205



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

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



0123

## 1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDA®UNITY EHEC/EPEC, réalisé sur la plateforme RIDA®UNITY, est une PCR multiplexe en temps réel pour la détection qualitative directe de l'ADN des facteurs de virulence des EHEC, STEC, EPEC et EIEC/Shigella spp. dans des échantillons de selles humaines non traitées et des échantillons de culture provenant de personnes présentant des signes et symptômes de gastro-entérite aiguë.

Le test RIDA®UNITY EHEC/EPEC est destiné à soutenir le diagnostic différentiel des infections par *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC, et EIEC/Shigella spp.) chez les patients présentant des symptômes de gastro-entérite conjointement avec d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC ou EIEC/Shigella spp.) et ne doivent pas être utilisés comme seule base de diagnostic.

Ce produit est destiné à un usage professionnel.

## 2. Résumé et explication du test

Les maladies diarrhéiques constituent un problème de santé important et provoquent environ 1,7 milliard de cas par an chez les enfants dans le monde<sup>(1)</sup>. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), avec environ 525 000 décès par an, elles constituent la deuxième cause de décès chez les enfants de moins de 5 ans, en particulier dans les pays en développement<sup>(1)</sup>. L'un des agents pathogènes bactériens les plus courants des maladies diarrhéiques est *Escherichia coli*.<sup>(2)</sup>

*E. coli* est une bactérie à Gram négatif mobile, fermentant le lactose et appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle est normalement présente dans le tractus gastro-intestinal, mais elle peut aussi provoquer des maladies diarrhéiques avec une morbidité et une mortalité élevées chez les enfants, notamment dans les pays en développement. Les classes suivantes d'*E. coli* diarrhéiques ont été identifiées sur la base des caractéristiques de virulence de la bactérie, de l'épidémiologie et des manifestations cliniques : *E. coli* entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxigène (ETEC), *E. coli* entérohémorragique (EHEC), *E. coli* entéroinvasif (EIEC) et *E. coli* entéroagréatif (EAEC). Tous ces pathotypes diarrhéiques d'*E. coli* peuvent être transmis par voie oro-fécale.<sup>(3)</sup>

Parmi les *E. coli* pathogènes intestinaux, les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) ont acquis une importance particulière. Ils constituent un sous-groupe des *E. coli* producteurs de shigatoxines et de vérotoxines (STEC et VTEC, respectivement). La pathogénicité des STEC peut être attribuée à leur capacité à coloniser l'intestin en adhérant aux cellules épithéliales intestinales. Après la colonisation, les bactéries sont capables de produire deux cytotoxines : la vérotoxine 1 et la vérotoxine 2. En raison de l'étroite ressemblance entre les vérotoxines et la shigatoxine de *Shigella dysenteriae*, les VTEC sont aussi appelés STEC. D'autres facteurs de pathogénicité importants pour le diagnostic des EHEC sont non seulement *stx1/stx2* (gènes des

shigatoxines), mais aussi le gène *eae* (gène attachant-effaçant d'*E. coli*), codant l'intimine, la protéine membranaire. Cette protéine membranaire est responsable de l'adhésion de l'agent pathogène aux cellules épithéliales intestinales.<sup>(4)</sup> Les symptômes cliniques pouvant être causés par les EHEC/STEC chez l'homme vont de la diarrhée sanglante au syndrome hémolytique et urémique (SHU).<sup>(2, 5)</sup> Les sources d'infection sont principalement les aliments contaminés, alors que moins de 1 000 bactéries suffisent à provoquer une infection par EHEC/STEC. Jusqu'à présent, la pire épidémie d'origine alimentaire causée par des STEC en Allemagne remonte à 2011. Cette épidémie a entraîné 3 816 infections par STEC identifiées et 54 décès, dont 32 associés au SHU.<sup>(5)</sup>

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont connus comme une cause de maladies diarrhéiques pédiatriques, notamment dans les pays en développement.<sup>(3)</sup> Les EPEC se distinguent des EHEC par l'absence de shigatoxines.<sup>(3)</sup> Les symptômes les plus courants associés à une infection par EPEC sont une diarrhée aqueuse, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et de la fièvre, alors que la dose infectieuse chez les adultes en bonne santé est d'environ  $10^8$  d'organismes.<sup>(5)</sup> Les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) et les *Shigella spp.* sont également à l'origine de maladies diarrhéiques dans le monde entier, notamment dans les pays en développement. Ce sont toutes deux des bactéries à Gram négatif qui sont biochimiquement et génétiquement très proches les unes des autres.<sup>(6)</sup> La pathogénicité des EIEC et des *Shigella spp.* repose sur l'invasion des cellules épithéliales intestinales par les plasmides et leur destruction. Les produits du gène *ipaH* (gène H de l'antigène du plasmide d'invasivité) sont responsables de ce processus. Ce gène est pertinent pour la détection des EIEC/*Shigella spp.* et permet de faire la distinction avec les EHEC. On considère que les épidémies d'infections par EIEC/*Shigella spp.* sont principalement dues à l'alimentation et se manifestent par des diarrhées, des douleurs abdominales, des nausées et de la fièvre.<sup>(6)</sup>

### 3. Principe du test

Le test RIDA®UNITY EHEC/EPEC est une PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation des gènes pour les facteurs de virulence d'EHEC, STEC, EPEC, EIEC/*Shigella* spp. dans des échantillons et des cultures de selles humaines.

Le traitement est entièrement automatisé avec le système RIDA®UNITY. Tout d'abord, les acides nucléiques sont extraits à l'aide de RIDA®UNITY Universal Extraction Kit et du Internal Control Kit.

La séquence cible est toujours détectée dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape (même pour les tests de l'ADN) : la transcription inverse (RT) et la PCR ultérieure se produisent dans le même flacon de réaction. Pendant le processus, l'ARN isolé (si présent) est transcrit en ADNc à l'aide de la transcriptase inverse. Les fragments de gènes spécifiques des facteurs de virulence *stx1/stx2*, *eae* et *ipaH* sont ensuite amplifiés par PCR en temps réel.

Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont marquées avec un extincteur à une extrémité et avec un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la Taq-Polymerase sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le RIDA®UNITY Internal Control Kit doit être utilisé en même temps pour pouvoir vérifier la préparation de l'échantillon et/ou l'inhibition potentielle de la PCR.

### 4. Contenu du paquet

Les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 96 déterminations.\*

**Tableau 1 :** Contenu du paquet

RÉF.	Réactif	Quantité		Couleur du bouchon
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 x	1935 µL	jaune, prêt à l'emploi
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 x	350 µL	rouge, prêt à l'emploi
UNZ2205PC	Positive Control	1 x	200 µL	bleu, prêt à l'emploi
UNZ2205NC	Negative Control	1 x	450 µL	blanc, prêt à l'emploi

\*En cas d'utilisation répétée et en petites séries, le nombre de réactions peut être réduit.

## 5. Instructions de conservation des réactifs

- Respecter les consignes de manipulation figurant dans le tableau 2 et stocker le kit directement après utilisation conformément aux instructions.
- Tous les réactifs doivent être conservés à l'abri de la lumière, à une température comprise entre -16 °C et -28 °C et, s'ils ne sont pas ouverts, ils peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. La garantie de qualité n'est plus valable après la date de péremption.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (p. ex., dans un réfrigérateur à 2 - 8 °C).
- La congélation et la décongélation répétées jusqu'à 8 fois n'affectent pas les propriétés du test.

**Tableau 2 :** Informations et conditions de conservation

	<b>Température de conservation</b>	<b>Durée maximale de conservation</b>
non ouvert	-16 °C à -28 °C	Utilisable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette
ouvert	-16 °C à -28 °C	8 cycles de congélation-décongélation

## 6. Réactifs requis, mais non fournis

Le test RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR est destiné exclusivement à être utilisé avec le système RIDA<sup>®</sup>UNITY. Les produits suivants sont absolument requis pour une utilisation correcte :

### 6.1 Réactifs

Les réactifs suivants sont nécessaires pour réaliser le test RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC :

Réactifs	Numéro d'article
RIDA <sup>®</sup> UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA <sup>®</sup> UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

### 6.2 Matériel de laboratoire

Le matériel suivant est nécessaire pour réaliser le test RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC :

Matériel
Système RIDA <sup>®</sup> UNITY ; numéro d'article : ZUNITY (R-Biopharm AG)
Consommables RIDA <sup>®</sup> UNITY (pointes, plaques, flacons de réaction, films). Voir le mode d'emploi du système RIDA <sup>®</sup> UNITY pour les informations relatives à la commande des consommables.
Agitateur-mélangeur vortex
Centrifugeuse de table
Gants jetables non poudrés

Cycleur externe (amélioration possible du système)
CFX96 <sup>™</sup> Dx (Bio-Rad)

Le kit RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC peut être utilisé avec d'autres cycleurs compatibles. Les autres instruments de PCR en temps réel doivent être vérifiés/validés par l'utilisateur. Veuillez contacter R-Biopharm AG à [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de) pour vérifier la compatibilité.

## 7. Mesures de précaution

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Ce test doit être réalisé uniquement par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.

Toujours respecter strictement le manuel d'utilisation lors de la réalisation du test.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec des plaies et des membranes muqueuses.

Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.

Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones de manipulation des échantillons.

Éviter de contaminer les échantillons et les composants du kit avec des microbes et des nucléases (DNase/RNase).

Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit. Ne pas échanger ou combiner les composants (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) d'un lot d'un kit avec les composants d'un autre lot.

Le kit de test peut être utilisé pendant 8 semaines après sa première ouverture (le kit peut être rechargé jusqu'à 6 fois). Ne pas utiliser le kit de test après sa date de péremption. Ces spécifications sont également vérifiées par le système RIDA®UNITY.

Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de l'élimination correcte de tous les réactifs et matériaux. Pour l'élimination, respecter les règlements nationaux.

De plus amples informations sur la fiche de données de sécurité (Safety Data Sheet, SDS) sont disponibles sous le numéro d'article à l'adresse suivante <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Pour les utilisateurs de l'Union européenne : signaler tout événement indésirable grave associé au produit à R-Biopharm AG et aux autorités nationales compétentes.

Le résumé de la sécurité et des performances (SSP) de ce produit sera disponible à l'adresse <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> dès que la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (EUDAMED) sera mise en place. Dans la base de données, rechercher le dispositif en utilisant l'UDI-DI figurant sur l'emballage extérieur du dispositif.

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

Il est recommandé d'utiliser des échantillons frais pour obtenir les meilleures performances possibles du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC.

Éviter de congeler et décongeler l'échantillon plusieurs fois.

Les échantillons de selles ne doivent pas être recueillis dans des conteneurs de transport renfermant des conservateurs, du sérum animal, des ions métal, des agents oxydants ou des détergents car ces substances peuvent interférer avec les tests RIDA®UNITY.

Il est recommandé de préparer des aliquotes des échantillons pour éviter des cycles répétés de décongélation/congélation. Les échantillons congelés doivent être décongelés immédiatement avant extraction pour éviter toute dégradation des acides nucléiques.

Respecter les instructions de stockage des échantillons dans les tableaux 3 à 6.

**Tableau 3 :** Conservation des échantillons – détection des EHEC

Échantillons de selles natifs		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 jours	≤ 7 jours	≤ 6 mois

Échantillons natifs - culture		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 jour	≤ 1 jour	-

Dans l'éluat (des selles ou de la culture)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

En cas de conservation à -20 °C / -80 °C, la congélation/décongélation répétée des échantillons de selles jusqu'à 5 fois n'affecte pas les propriétés du test.

En cas de conservation à -20 °C, la congélation/décongélation répétée de l'éluat (des selles ou de la culture) jusqu'à 3 fois n'affecte pas les propriétés du test.

Ne pas faire de cultures à partir de selles préalablement congelées, car la congélation affecte gravement les caractéristiques de croissance des agents pathogènes, ce qui peut entraîner des résultats faussement négatifs.

**Tableau 4 :** Conservation des échantillons – détection des STEC

<b>Échantillons de selles natifs</b>		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 jours	≤ 7 jours	≤ 6 mois

<b>Échantillons natifs - culture</b>		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 jour	≤ 1 jour	-

<b>Dans l'éluat (des selles ou de la culture)</b>		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

En cas de conservation à -20 °C / -80 °C, la congélation/décongélation répétée des échantillons de selles jusqu'à 5 fois n'affecte pas les propriétés du test.

En cas de conservation à -20 °C, la congélation/décongélation répétée de l'éluat (des selles ou de la culture) jusqu'à 3 fois n'affecte pas les propriétés du test.

Ne pas faire de cultures à partir de selles préalablement congelées, car la congélation affecte gravement les caractéristiques de croissance des agents pathogènes, ce qui peut entraîner des résultats faussement négatifs.

**Tableau 5 :** Conservation des échantillons – détection des EPEC

Échantillons de selles natifs		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 jours	≤ 7 jours	≤ 6 mois

Échantillons natifs - culture		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 jour	≤ 1 jour	-

Dans l'éluat (des selles ou de la culture)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

En cas de conservation à -20 °C / -80 °C, la congélation/décongélation répétée des échantillons de selles jusqu'à 5 fois n'affecte pas les propriétés du test.

En cas de conservation à -20 °C, la congélation/décongélation répétée de l'éluat (des selles ou de la culture) jusqu'à 3 fois n'affecte pas les propriétés du test.

Ne pas faire de cultures à partir de selles préalablement congelées, car la congélation affecte gravement les caractéristiques de croissance des agents pathogènes, ce qui peut entraîner des résultats faussement négatifs.

**Tableau 6 :** Conservation des échantillons – détection des EIEC/*Shigella* spp.

Échantillons de selles natifs		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 jour	≤ 7 jours	≤ 6 mois

Échantillons natifs - culture		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 1 jour	-

Dans l'éluat (des selles ou de la culture)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

En cas de conservation à -20 °C / -80 °C, la congélation/décongélation répétée des échantillons de selles jusqu'à 5 fois n'affecte pas les propriétés du test.

En cas de conservation à -20 °C, la congélation/décongélation répétée de l'éluat (des selles ou de la culture) jusqu'à 3 fois n'affecte pas les propriétés du test.

Ne pas faire de cultures à partir de selles préalablement congelées, car la congélation affecte gravement les caractéristiques de croissance des agents pathogènes, ce qui peut entraîner des résultats faussement négatifs.

### **8.1 Préparation de l'ADN à partir d'échantillons de selles et de culture**

Pour isoler l'ADN des échantillons de selles et de culture, utiliser le RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Suivre les procédures correctes dans le mode d'emploi du RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (section : Préparation de l'acide nucléique à partir d'échantillons de selles ; section : Préparation de l'acide nucléique à partir d'échantillons de culture).

## **9. Réalisation du test**

Placer les échantillons et les réactifs du kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC sur le système RIDA®UNITY au début de l'utilisation.

Au préalable, mélanger correctement le **Reaction Mix**, **Negative Control**, et **Positive Control** au vortex. Ne pas mélanger le **Enzyme Mix** au vortex. Ensuite, centrifuger brièvement tous les composants.

Les tubes PCR des échantillons à analyser doivent être positionnés au préalable dans le cycleur PCR intégré.

Des supports sont disponibles pour charger correctement les réactifs et les consommables dans le système. Pour le processus de chargement, respecter les instructions du système RIDA®UNITY. Consulter les sections pertinentes du manuel du système RIDA®UNITY (section : Réalisation d'une analyse).

Le test RIDA®UNITY EHEC/EPEC ne peut être utilisé qu'en combinaison avec le RIDA®UNITY Internal Control Kit. Cela permet de reconnaître rapidement une inhibition potentielle de la PCR, de vérifier l'intégrité des réactifs et de confirmer la réussite de l'extraction des acides nucléiques. La procédure est décrite dans le mode d'emploi du RIDA®UNITY Internal Control Kit (section : Réalisation du test).

Le traitement automatique est décrit dans le manuel du système RIDA®UNITY (section : Réalisation d'une analyse).

## 9.1 Réglages du dispositif

### 9.1.1 Profil universel de PCR en temps réel

Pour harmoniser les tests RIDA®UNITY, le test RIDA®UNITY EHEC/EPEC a été vérifié par rapport au profil universel. Il est ainsi possible de combiner les tests ADN et ARN entre eux. En général, la transcription inverse arrive donc en premier dans le profil universel.

**Tableau 7 :** Profil PCR en temps réel universel pour RIDA®UNITY

<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	Maximum

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

**Tableau 8 :** Profil universel de PCR en temps réel pour CFX96™ Dx

<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	Maximum

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

## 9.2 Réglage du canal de détection

**Tableau 9 :** Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
<b>R-Biopharm RIDA®UNITY</b>	<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
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	<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. Contrôle qualité - signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse RIDA®SEEK du système RIDA®UNITY. Le **Negative Control** et le **Positive Control** doivent afficher les résultats appropriés (voir tableau 9).

Le **Positive Control** est présent à une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ L. Chaque analyse de PCR utilise une quantité totale de  $5 \times 10^3$  copies.

Le **Negative Control** contient déjà le contrôle interne RIDA®UNITY. Comme les contrôles ne contiennent pas de matrice, aucun signal n'est à prévoir dans les canaux cibles. Des signaux positifs dans le canal IC avec lequel le contrôle interne est détecté sont indispensables (voir tableau 10).

**Tableau 10** : Pour être valide, une analyse de PCR doit remplir les conditions suivantes :

Échantillon	Résultat	IC Ct	Ct gène cible
Contrôle positif	+	S/O*	Voir le Certificate of Analysis
Contrôle négatif	-	Ct > 20	0

\*Dans certaines circonstances, le canal IC peut avoir un signal positif dans le contrôle positif et ne doit donc pas être évalué.

Si le contrôle positif n'est pas dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées lors de la PCR, y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées lors de la PCR, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé
- Procédure de test correcte

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir renouvelé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

## 11. Évaluation et interprétation

Les échantillons sont évalués et interprétés à l'aide du logiciel d'analyse du système RIDA®UNITY, RIDA®SEEK.

Il n'existe actuellement aucune méthode de référence ou matériau de référence reconnu au niveau international pour la normalisation. La traçabilité métrologique des matériaux de contrôle par rapport aux étalons internes de R-Biopharm AG repose sur des amplicons d'ADN spécifiques.

Pour de plus amples informations sur la traçabilité métrologique, veuillez contacter R-Biopharm AG.

Les valeurs spécifiées, plages et autres précisions figurent sur le certificat d'analyse (Certificate of Analysis, CoA).

**Tableau 11** : Interprétation des résultats\*

Détection de				
<i>stx1/stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	IC	Résultat
+	-	-	+/-	<b>STEC (ECEH) détectables</b>
-	+	-	+/-	<b>EIEC/<i>Shigella</i> spp. détectables</b>
-	-	+	+/-	<b>ECEP détectables</b>
+	+	-	+/-	<b>STEC (EHEC) et EIEC/<i>Shigella</i> spp. détectables</b>
+	-	+	+/-	<b>EHEC détectables</b>
-	+	+	+/-	<b>EIEC/<i>Shigella</i> spp. et EPEC détectables</b>
+	+	+	+/-	<b>EHEC et EIEC/<i>Shigella</i> spp. détectables</b>
-	-	-	+	<b>Gènes cibles non détectables</b>
-	-	-	-	<b>Non valide</b>

\* += positif  
- = négatif

La loi sur la protection contre les infections (IfSG) décrit les EHEC comme les *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) qui sont des pathogènes humains. Étant donné qu'une définition exacte des STEC pathogènes pour l'homme ne peut être établie à l'heure actuelle, **chaque** STEC est considéré comme un EHEC potentiel.<sup>(5)</sup>

Un échantillon est positif si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est également positif si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun signal pour le Internal Control. La détection du Internal Control n'est pas indispensable dans ce cas, car les concentrations élevées d'amplicons peuvent provoquer un signal faible ou absent du Internal Control.

Un échantillon est négatif si l'ADN de l'échantillon ne présente pas de signal d'amplification dans le système de détection, mais que le Internal Control présente un signal visible. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du Internal Control.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le processus d'extraction.

## 12. Limites de la méthode

1. Le test RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC détecte l'ADN des facteurs de virulence des EHEC, STEC, EPEC et EIEC/Shigella spp. dans les selles humaines non traitées et les échantillons de culture. Ce test ne permet pas d'établir de rapport entre la valeur de Ct mesurée et la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés au regard des symptômes cliniques dans leur ensemble.
2. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur le résultat du test de biologie moléculaire. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
3. Ce test est approuvé uniquement pour un traitement automatisé utilisant le système RIDA<sup>®</sup>UNITY.
4. Ce test est seulement vérifié pour les échantillons de selles et de culture
5. Lors de l'utilisation de la matrice de culture, ne pas transférer le milieu gélosé dans la réaction PCR, car cela peut entraîner des interférences potentielles.
6. Un échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects de l'échantillon ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
7. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides.
8. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LoD 95 %) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
9. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC.
10. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique que les gènes cibles (EHEC, *stx1/2*, *eae* ; STEC, *stx1/2* ; EPEC, *eae* ; et EIEC/Shigella spp., *ipaH*) sont présents.
11. Ce test doit être réalisé conformément aux BPL (Bonnes pratiques de laboratoire). Les utilisateurs doivent suivre scrupuleusement les instructions du fabricant lors de la réalisation du test.

## 13. Performances

### 13.1 Performances cliniques

Le test RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR a été comparé dans un laboratoire externe avec un test de référence avec un marquage CE à partir de 276 échantillons de selles provenant de patients présentant des symptômes d'infection gastro-intestinale.

Les résultats montrent une sensibilité et une spécificité très élevées dans la détection des facteurs de virulence des EHEC, STEC, EPEC, et EIEC/Shigella spp. grâce à l'utilisation du kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC.

**Tableau 12** : Détection de *stx1/2* - échantillons de selles

		PCR de référence		Total
		Positif	Négatif	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>stx1/2</i>	Positif	122	0	122
	Négatif	5	149	154
	Total	127	149	276

Sensibilité relative (IC 95 %)	96,1 % (91,1 % - 98,7 %)
Spécificité relative (IC 95 %)	100 % (97,6 % - 100 %)

**Tableau 13** : Détection de *ipaH* - échantillons de selles

		PCR de référence		Total
		Positif	Négatif	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>ipaH</i>	Positif	65	0	65
	Négatif	0	211	211
	Total	65	211	276

Sensibilité relative (IC 95 %)	100 % (94,5 % - 100 %)
Spécificité relative (IC 95 %)	100 % (98,3 % - 100 %)

**Tableau 14 :** Détection de *eae* - échantillons de selles

		PCR de référence		Total
		Positif	Négatif	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>eae</i>	Positif	179	0	179
	Négatif	4	93	97
	Total	183	93	276

Sensibilité relative (IC 95 %)	97,8 % (94,5 % - 100 %)
Spécificité relative (IC 95 %)	100 % (96,1 % - 100 %)

## 13.2 Performances analytiques

### 13.2.1 Limite de détection (LoD 95 %)

Un échantillon de contrôle positif (échantillons de selles négatifs, enrichis ou échantillon de culture) a été mesuré en cinq étapes de dilution (par étapes de 0,25 log) pour chaque cible, avec 20 réplicats par étape dans un lot, afin de déterminer la LoD. Cette analyse a été suivie d'une analyse probit. La LoD calculée a ensuite été confirmée à l'aide de 20 réplicats par cible pour l'étape de dilution/concentration calculée.

Les souches suivantes ont été utilisées pour les tests :

- *stx1/stx2* : *Escherichia coli* D3509 (la LoD pour *stx2* a été déterminée car *stx2* est associé au syndrome hémolytique et urémique)
- *ipaH* : *Escherichia coli* Fr1368
- *eae* : *Escherichia coli* DSM8695

Pour la détection de l'ADN des EHEC, STEC, EPEC et EIEC/Shigella spp. à l'aide du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC sur le système UNITY, les limites de détection (LoD) suivantes ont été déterminées.

Les résultats de ces mesures sont indiqués dans le tableau 15.

**Tableau 15 :** Résultats de la limite de détection du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC pour les cibles *stx1/2*, *ipaH* et *eae*.

	Matrice	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Selles	476 000 CFU/mL	5 300 CFU/mL	125 000 CFU/mL
	Culture	2 130 CFU/mL	798 CFU/mL	2 890 CFU/mL

\*CFU : Colony Forming Units

La LoD pour *stx1/2* dans les échantillons de selles a été déterminée à 476 000 CFU/mL.

La LoD pour *ipaH* dans les échantillons de selles a été déterminée à 5 300 CFU/mL.

La LoD pour *eae* dans les échantillons de selles a été déterminée à 125 000 CFU/mL.

La LoD pour *stx1/2* dans les échantillons de selles a été déterminée à 2 130 CFU/mL.

La LoD pour *ipaH* dans les échantillons de selles a été déterminée à 798 CFU/mL.

La LoD pour *eae* dans les échantillons de selles a été déterminée à 2 890 CFU/mL.

Pour le flux de travail amélioré utilisant le CFX96™ Dx, ces valeurs de LoD ont été confirmées en supposant que de rester dans une fourchette de 2 à 3 fois la plage de la LoD.

### 13.2.2 Spécificité analytique

#### Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la PCR en temps réel et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides. De ce fait, les effets de diverses substances ont été étudiés, compte tenu de leur utilisation répandue en cas d'infections gastro-intestinales ou de leur présence répandue dans les échantillons correspondants.

Les substances susceptibles d'influencer de manière significative les résultats des tests ont été examinées dans un premier temps à des concentrations élevées (le triple de la dose quotidienne ou la simulation du pire cas) dans un test d'interférence. Aucune interférence n'a été identifiée pour les substances figurant dans le tableau 16.

**Tableau 16** : Substances potentiellement interférentes

Substance potentiellement interférente	Concentration
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg comprimés pelliculés (azithromycine)	0,75 % [p/v]
Sulfate de baryum	18,5 % [v/v]
Édulcorant liquide Cologran® (saccharine + cyclamate)	1,3 % [p/v]
Sang humain	5 % [v/v]
Comprimés de charbon de bois 250 mg (charbon de bois)	6 % [p/v]
Loperamid-ratiopharm® akut (lopéramide)	0,02 % [v/v]
Mucines	5 % [p/v]
Acide stéarique/acide palmitique	40 % [p/v]

## Réactions croisées

Divers organismes (bactéries, parasites, champignons et virus) que l'on trouve couramment dans la matrice des selles ont été étudiés. Les micro-organismes étudiés dans le cadre de ce test ont été sélectionnés soit en raison de leur présence naturelle dans les échantillons de selles, soit en raison des symptômes qu'ils provoquent en tant que pathogènes gastro-intestinaux. Pour les analyses, on a utilisé des cultures de bactéries (entre  $10^6$  et  $10^9$  CFU/mL), des cultures de champignons, des cultures de virus, des surnageant de culture de virus, des isolats ou des étalons LGC pour les organismes respectifs.

Le test RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR est spécifique pour EHEC, STEC, EPEC, et EIEC/Shigella spp. Aucune réaction croisée avec les espèces suivantes n'a été détectée (voir Tab. 17) :

**Tableau 17** : Organismes à réaction croisée potentielle

Organisme	Résultat du test*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adénovirus 40	-	-	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
Astrovirus 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> sous-esp. <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>	-	-	-

\* - = négatif

\*\* *Giardia intestinalis* et *Giardia lamblia* sont le même organisme.

### 13.2.3 Précision

La précision du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR a été déterminée pour les niveaux de considération suivants.

Précision *intra*-essai : déterminée sur 5 échantillons de contrôle avec 20 réplicats chacun sur le RIDA®UNITY dans des conditions identiques.

Précision *inter*-essais : déterminée sur 5 échantillons de contrôle testés en double au cours de 20 analyses réalisées sur 10 jours (2 analyses par jour) par différents techniciens dans des conditions reproductibles.

Les tests de précision *intra*-essai et *inter*-essais ont été réalisés à l'aide de trois lots différents.

Les coefficients de variation obtenus pour chaque mesure en utilisant le test RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR sur le RIDA®UNITY et le CFX96™ Dx étaient de 4,29 %.

**Tableau 18** : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC pour *stx1/2* à partir d'échantillons de selles (système RIDA®UNITY).

Valeur moyenne Ct / CV	Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots	
	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot des kits 1 à 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 (%)	S/O	S/O	S/O	2,15 %	2,23 %	2,26 %	2,28 %
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	CV (%)	2,34 %	2,05 %	2,13	S/O	S/O	S/O	S/O

**Tableau 19** : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC pour *stx1/2* à partir d'échantillons de selles (CFX96™ Dx).

Valeur moyenne Ct / CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot des kits 1 à 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 (%)	S/O	S/O	S/O	2,96 %	2,90 %	2,76 %	3,04 %
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	CV (%)	1,52 %	1,59 %	3,43 %	S/O	S/O	S/O	S/O

**Tableau 20** : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC pour ipaH à partir d'échantillons de selles (système RIDA®UNITY).

Valeur moyenne Ct / CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot des kits 1 à 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 (%)	S/O	S/O	S/O	1,44 %	1,34 %	1,45 %	1,42 %
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	CV (%)	0,88 %	0,77 %	0,69 %	S/O	S/O	S/O	S/O

**Tableau 21** : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC pour ipaH à partir d'échantillons de selles (CFX96™ Dx).

Valeur moyenne Ct / CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot des kits 1 à 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 (%)	S/O	S/O	S/O	1,27 %	1,45 %	1,36 %	1,36 %
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	CV (%)	0,89 %	0,53 %	0,70 %	S/O	S/O	S/O	S/O

**Tableau 22 :** Résultats de la précision du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC pour eae à partir d'échantillons de selles (système RIDA®UNITY).

Valeur moyenne Ct / CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot des kits 1 à 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 (%)	S/O	S/O	S/O	1,81 %	1,78 %	1,81 %	1,80 %
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	CV (%)	1,24 %	0,78 %	1,18 %	S/O	S/O	S/O	S/O

**Tableau 23** : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY EHEC/EPEC pour eae à partir d'échantillons de selles (CFX96™ Dx).

Valeur moyenne Ct / CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot des kits 1 à 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 (%)	S/O	S/O	S/O	1,32 %	1,58 %	1,48 %	1,47 %
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	CV (%)	0,73 %	0,55 %	0,68 %	S/O	S/O	S/O	S/O

### 13.2.4 Réactivité analytique

La réactivité du test IDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR a été testée sur un panel défini de souches d'*E. coli* et de *Shigella* (voir Tab. 24).

**Tableau 24** : Test de la réactivité analytique

Souche	Résultat*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>E. coli</i> ( <i>stx1c, stx2b</i> )	+	-	-
<i>E. coli</i> ( <i>stx1a, stx2c, eae</i> )	+	-	+
<i>E. coli</i> ( <i>stx1d</i> )	+	-	
<i>E. coli</i> ( <i>stx2a, eae</i> )	+	-	+
<i>E. coli</i> ( <i>stx2d</i> )	+	-	-
<i>E. coli</i> ( <i>stx2e</i> )	+	-	-
<i>E. coli</i> ( <i>stx2f, eae</i> )	+	-	+
<i>E. coli</i> ( <i>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</i> ( <i>ipaH</i> )	-	+	-
<i>Shigella dysenteriae</i> ( <i>ipaH</i> )	-	+	-
<i>Shigella flexneri</i> ( <i>ipaH</i> )	-	+	-
<i>Shigella sonnei</i> ( <i>ipaH</i> )	-	+	-

\*+ = positif (au moins 2 réplicats positifs sur 3)

- = négatif

## 14. Historique des versions

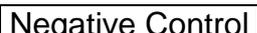
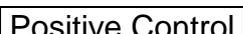
Numéro de version	Section et désignation
2022-06-14	Version de la publication

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de conservation
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

### Symboles spécifiques aux tests

	Mélange réactionnel
	Mélange d'enzymes
	Contrôle négatif
	Contrôle positif

## 16. Références

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).