

RIDA® UNITY EHEC/EPEC

REF UN2205



1. Προβλεπόμενη χρήση

Για διαγνωστική *in vitro* χρήση. Η δοκιμασία RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC, η οποία πραγματοποιείται στην πλατφόρμα RIDA[®]UNITY, είναι μία πολυπλεκτική PCR πραγματικού χρόνου για την άμεση ποιοτική ανίχνευση του DNA των παραγόντων λοιμοτοξικότητας EHEC, STEC, EPEC και EIEC/*Shigella* spp. σε μη επεξεργασμένα δείγματα ανθρώπινων κοπράνων και δείγματα καλλιέργειας από άτομα με σημεία και συμπτώματα οξείας γαστρεντερίτιδας.

Η δοκιμασία RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC προορίζεται ως βοήθημα για τη διαφορική διάγνωση λοιμώξεων από *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC, και EIEC/*Shigella* spp.) σε ασθενείς με συμπτώματα γαστρεντερίτιδας, σε συνδυασμό με άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.

Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη λοίμωξη από *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC, ή EIEC/*Shigella* spp.) και δεν θα πρέπει να αποτελούν τη μοναδική βάση της διάγνωσης.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες.

2. Περίληψη και επεξήγηση της δοκιμασίας

Οι διαρροϊκές νόσοι αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας με περίπου 1,7 δισεκατομμύρια περιπτώσεις ετησίως σε παιδιά παγκοσμίως.⁽¹⁾ Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), με περίπου 525.000 θανάτους ετησίως, αυτές οι ασθένειες αποτελούν τη δεύτερη κύρια αιτία θανάτου σε παιδιά κάτω των 5 ετών, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες.⁽¹⁾ Ένα από τα πιο κοινά παθογόνα που σχετίζονται με τη διαρροϊκή νόσο είναι το *Escherichia coli*.⁽²⁾

Το *E. coli* είναι ένα κινητικό, αρνητικό κατά Gram βακτήριο που πραγματοποιεί ζύμωση της λακτόζης και ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Φυσιολογικά αποικίζει τον γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά μπορεί επίσης να προκαλέσει διαρροϊκές νόσους με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας στα παιδιά, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Οι παρακάτω τύποι διαρροϊκού *E. coli* ταυτοποιήθηκαν βάσει των χαρακτηριστικών λοιμοτοξικότητας, της επιδημιολογίας και των κλινικών εκδηλώσεων του βακτηρίου: εντεροπαθογόνος *E. coli* (EPEC), εντεροτοξιγονική *E. coli* (ETEC), εντεροαιμορραγική *E. coli* (EHEC), εντεροδιηθητική *E. coli* (EIEC), και εντεροπροσκολλητική *E. coli* (EAEC). Όλοι αυτοί οι διαρροϊκοί παθότυποι *E. coli* μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού.⁽³⁾

Μεταξύ των παθογόνων εντερικών στελεχών *E. coli*, ιδιαίτερη σημασία έχει αποκτήσει η εντεροαιμορραγική *E. coli* (EHEC). Αποτελούν υπότυπο των βακτηρίων *E. coli* που παράγουν τοξίνη Shiga ή βεροτοξίνη (STEC και VTEC, αντίστοιχα). Η παθογονικότητα των παθογόνων STEC οφείλεται στην ικανότητά τους να εγκαθίστανται στον γαστρεντερικό σωλήνα μέσω προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Μετά την εποίκηση, τα βακτήρια μπορούν να παράγουν δύο τοξίνες: βεροτοξίνη 1 και 2. Λόγω της ομοιότητας των βεροτοξινών με την τοξίνη Shiga του *Shigella dysenteriae*, τα παθογόνα VTEC αποκαλούνται επίσης και STEC. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες παθογένειας για τη διάγνωση των βακτηρίων EHEC

δεν είναι μόνο οι *stx1/stx2* (γονίδια της τοξίνης Shiga), αλλά και το γονίδιο *eae* (*E. coli* attaching and effacing gene), το οποίο κωδικοποιεί τη μεμβρανική πρωτεΐνη ιντιμίνη. Αυτή η μεμβρανική πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση του παθογόνου στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα.⁽⁴⁾ Τα κλινικά συμπτώματα που μπορεί να προκληθούν από τα στελέχη EHEC/STEC στους ανθρώπους ποικίλουν από αιμορραγική διάρροια έως αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS).^(2, 5) Οι πηγές της μόλυνσης είναι κυρίως μολυσμένη τροφή, ενώ αρκούν λιγότερα από 1.000 βακτήρια για να προκαλέσουν λοίμωξη από EHEC/STEC. Η χειρότερη τροφική επιδημική έξαρση που προκλήθηκε από STEC στη Γερμανία μέχρι στιγμής συνέβη το 2011. Αυτή η επιδημική έξαρση είχε ως αποτέλεσμα 3816 ταυτοποιημένες λοιμώξεις από STEC και 54 θανάτους, από τους οποίους οι 32 σχετιζόνταν με HUS.⁽⁵⁾

Τα εντεροπαθογόνα βακτήρια *E. coli* (EPEC) είναι γνωστά ως μια αιτία παιδιατρικών διαρροϊκών νόσων, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες.⁽³⁾ Τα στελέχη EPEC μπορούν να διακριθούν από τα EHEC λόγω της απουσίας τοξινών Shiga.⁽³⁾ Τα πιο συνήθη συμπτώματα που σχετίζονται με λοίμωξη από EPEC είναι υδαρής διάρροια, κοιλιακό άλγος, ναυτία, έμετος και πυρετός, ενώ η μολυσματική δόση σε υγιείς ενήλικες είναι περίπου 10^8 οργανισμοί.⁽⁵⁾

Η εντεροδιηθητική *E. coli* (EIEC) και τα υποείδη *Shigella* spp. παρομοίως προκαλούν διαρροϊκές νόσους παγκοσμίως, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Και τα δύο στελέχη αποτελούν βακτήρια αρνητικά κατά Gram τα οποία συνδέονται στενά μεταξύ τους όσον αφορά τη βιοχημεία και τη γενετική τους.⁽⁶⁾ Η παθογονικότητα της EIEC και των στελεχών του γένους *Shigella* spp. βασίζεται στην πλασμιδικά μεσολαβούμενη προσβολή και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού συστήματος. Για αυτήν την προσβολή είναι υπεύθυνα τα προϊόντα του πλασμιδιακού γονιδίου invasion plasmid antigen H gene (*ipaH*). Το γονίδιο αυτό σχετίζεται με την ανίχνευση EIEC/*Shigella* spp. και αυτός ο παθότυπος μπορεί συνεπώς να διαφοροποιηθεί από αυτόν του ETEC. Οι επιδημικές εξάρσεις των λοιμώξεων από EIEC/*Shigella* spp. θεωρείται ότι οφείλονται σε κατανάλωση μολυσμένης τροφής και εκδηλώνονται με διάρροια, κοιλιακό άλγος, ναυτία και πυρετό.⁽⁶⁾

3. Αρχές της δοκιμασίας

Η δοκιμασία RIDA®UNITY EHEC/EPEC είναι μια πολυπλεκτική PCR πραγματικού χρόνου για την άμεση ποιοτική ανίχνευση και τον διαχωρισμό των γονιδίων των παραγόντων λοιμοτοξικότητας των EHEC, STEC, EPEC, και EIEC/*Shigella* spp. σε δείγματα ανθρώπινων κοπράνων ή καλλιέργειας.

Με το σύστημα RIDA®UNITY, η επεξεργασία είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Αρχικά, τα νουκλεϊκά οξέα απομονώνονται χρησιμοποιώντας το kit RIDA®UNITY Universal Extraction Kit και το kit δειγμάτων εσωτερικού ελέγχου Internal Control Kit. Η αλληλουχία-στόχος ανιχνεύεται πάντα με μία μέθοδο RT-PCR πραγματικού χρόνου ενός σταδίου (ακόμα και στην περίπτωση δοκιμασιών που χρησιμοποιούν DNA), όπου η αντίστροφη μεταγραφή (RT) και η PCR που επακολουθεί πραγματοποιούνται στο ίδιο φιαλίδιο αντίδρασης. Κατά τη διαδικασία, το απομονωμένο RNA (εάν υπάρχει) μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης. Στη συνέχεια, τα ειδικά θραύσματα των γονιδίων των παραγόντων λοιμοτοξικότητας *stx1/stx2*, *eae*, και *ipaH* ενισχύονται με την PCR πραγματικού χρόνου.

Οι ενισχυμένες αλληλουχίες-στόχοι ανιχνεύονται με χρήση ανιχνευτών υδρόλυσης που είναι σημασμένοι με μια χρωστική απόσβεσης στο ένα άκρο και μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (φθοροφόρο) στο άλλο. Οι ανιχνευτές υβριδοποιούνται με το αμπλικόνιο παρουσία μιας αλληλουχίας-στόχου. Κατά το στάδιο της επιμήκυνσης, Η Taq Polymerase διαχωρίζει τη χρωστική αναφοράς από τη χρωστική απόσβεσης. Η χρωστική αναφοράς εκπέμπει ένα φθορίζον σήμα που ανιχνεύεται από την οπτική μονάδα ενός μηχανήματος PCR πραγματικού χρόνου. Το σήμα φθορισμού αυξάνεται με την ποσότητα των σχηματιζόμενων αμπλικονίων. Παράλληλα με τη δοκιμασία θα πρέπει να χρησιμοποιείται και το kit RIDA®UNITY Internal Control Kit προκειμένου να μπορεί να γίνει έλεγχος της προετοιμασίας των δειγμάτων ή/και πιθανής αναστολής της PCR.

4. Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια στο kit επαρκούν για 96 προσδιορισμούς*.

Πίν. 1: Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Αριθμός αναφοράς	Αντιδραστήριο	Ποσότητα		Χρώμα καλύμματος
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	κίτρινο, έτοιμο για χρήση
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	κόκκινο, έτοιμο για χρήση
UNZ2205PC	Positive Control	1 ×	200 µL	μπλε, έτοιμο για χρήση
UNZ2205NC	Negative Control	1 ×	450 µL	λευκό, έτοιμο για χρήση

* Με επαναλαμβανόμενη χρήση και για μικρότερες ομάδες δειγμάτων, ο αριθμός των αντιδράσεων μπορεί να μειωθεί.

5. Οδηγίες φύλαξης

- Ακολουθήστε τις οδηγίες χειρισμού που φαίνονται στον Πίνακα 2 και φυλάξτε το κιτ αμέσως μετά τη χρήση, σύμφωνα με τις πληροφορίες που αναγράφονται.
- Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ και, εάν δεν ανοιχτούν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν έως την ημερομηνία λήξης που είναι εκτυπωμένη στην ετικέτα. Η εγγύηση ποιότητας σταματάει να ισχύει μετά την ημερομηνία λήξης.
- Όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποψύχονται προσεκτικά πριν τη χρήση (π.χ. σε ψυγείο στους $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι κατάψυξης και απόψυξης έως και 8 φορές δεν επηρεάζουν τις ιδιότητες της δοκιμασίας.

Πίν. 2: Συνθήκες και πληροφορίες φύλαξης

	Θερμοκρασία φύλαξης	Μέγιστος χρόνος φύλαξης
μη ανοιγμένη συσκευασία	$-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ με $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$	Μπορεί να χρησιμοποιηθεί έως την τυπωμένη ημερομηνία λήξης
ανοιγμένη συσκευασία	$-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ με $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$	8 κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης

6. Απαιτούμενα αλλά μη παρεχόμενα αντιδραστήρια

Η δοκιμασία RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR προορίζεται για χρήση μόνο με το σύστημα RIDA®UNITY System. Για την ορθή χρήση απαιτούνται αυστηρά τα παρακάτω προϊόντα:

6.1 Αντιδραστήρια

Για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC απαιτούνται τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Κωδικός προϊόντος
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC απαιτείται ο εξής εξοπλισμός:

Εξοπλισμός
Σύστημα RIDA®UNITY·κωδικός προϊόντος: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Αναλώσιμα RIDA®UNITY (άκρα πιπέτας, πλάκες, φιαλίδια αντίδρασης, μεμβράνες). Βλ. τις οδηγίες χρήσης για το σύστημα RIDA®UNITY, και για πληροφορίες παραγγελίας αναλώσιμων.
Αναδευτήρας vortex
Επιτραπέζια φυγόκεντρος
Γάντια μιας χρήσης χωρίς πούδρα
Άλλος κυκλοποιητής (πιθανή βελτίωση συστήματος)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Το kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα συμβατά μηχανήματα PCR. Εναλλακτικά μηχανήματα PCR θα πρέπει να επαληθεύονται/εγκρίνονται από τον χρήστη. Επικοινωνήστε με την R-Biopharm AG στο pcr@r-biopharm.de για έλεγχο διαθεσιμότητας.

7. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις για τους χρήστες

Για διαγνωστική *in vitro* χρήση.

Αυτή η δοκιμασία πρέπει να διεξάγεται μόνο από πιστοποιημένο προσωπικό εργαστηρίου. Τηρείτε τις οδηγίες σχετικά με την εργασία σε ιατρικά εργαστήρια. Τηρείτε πάντα αυστηρά τις οδηγίες χρήσης του εγχειριδίου για τη διεξαγωγή αυτής της δοκιμασίας.

Μην μεταφέρετε μέσω πιπέτας δείγματα ή αντιδραστήρια χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Αποφύγετε την επαφή με δέρμα που παρουσιάζει τραύματα και βλεννογόνους υμένες.

Χρησιμοποιείτε εξοπλισμό ατομικής προστασίας (κατάλληλα γάντια, εργαστηριακή ποδιά, προστατευτικά γυαλιά) κατά τον χειρισμό αντιδραστηρίων και δειγμάτων και πλένετε τα χέρια μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας.

Μην καπνίζετε, τρώτε ή πίνετε σε χώρους όπου γίνεται χειρισμός δειγμάτων. Αποφύγετε την επιμόλυνση των δειγμάτων και των περιεχομένων του κιτ με μικρόβια και νουκλεάσες (DNase/RNase).

Τα κλινικά δείγματα θα πρέπει να θεωρούνται ως πιθανώς μολυσματικά και θα πρέπει να απορρίπτονται κατάλληλα, όπως και όλα τα αντιδραστήρια και τα υλικά που έρχονται σε επαφή με δείγματα τα οποία χαρακτηρίζονται ως πιθανώς μολυσματικά.

Μην ανταλλάσσετε και μην αναμιγνύετε τα περιεχόμενα (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) από κιτ μίας παρτίδας με τα περιεχόμενα μιας άλλης παρτίδας.

Το κιτ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για 8 εβδομάδες μετά το πρώτο άνοιγμα (το κιτ μπορεί να επαναφορτωθεί έως 6 φορές). Μη χρησιμοποιείτε το κιτ μετά την ημερομηνία λήξης. Αυτές οι παράμετροι ελέγχονται επίσης από το σύστημα RIDA®UNITY System.

Οι χρήστες είναι υπεύθυνοι για τη δέουσα απόρριψη όλων των αντιδραστηρίων και των υλικών μετά τη χρήση. Εφαρμόστε τους εθνικούς κανονισμούς για τη διαδικασία απόρριψης.

Μπορείτε να βρείτε περαιτέρω λεπτομέρειες για το δελτίο δεδομένων ασφαλείας (Safety Data Sheet, SDS) με τον κωδικό προϊόντος στη διεύθυνση <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Για τους χρήστες στην Ευρωπαϊκή Ένωση: Αναφέρετε όλες τις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με το προϊόν στην R-Biopharm AG και τις αρμόδιες κρατικές αρχές.

Η περίληψη της ασφάλειας και των επιδόσεων (SSP) για αυτό το προϊόν θα είναι διαθέσιμη στη διεύθυνση <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> όταν είναι διαθέσιμη η ευρωπαϊκή βάση δεδομένων για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα (EUDAMED). Στη βάση δεδομένων, αναζητήστε το προϊόν χρησιμοποιώντας το UDI-DI που βρίσκεται στην εξωτερική συσκευασία του προϊόντος.

8. Συλλογή και φύλαξη δειγμάτων

Για τη βέλτιστη δυνατή απόδοση της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC, συνιστάται η χρήση φρέσκων δειγμάτων.

Αποφύγετε την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη του δείγματος.

Μη συλλέγετε τα δείγματα κοπράνων σε περιέκτες μεταφοράς που περιέχουν μέσα μεταφοράς με συντηρητικά, ορούς ζώων, μεταλλικά ιόντα, οξειδωτικούς παράγοντες ή απορρυπαντικά, καθώς τέτοιες ουσίες ενδέχεται να επηρεάσουν τις δοκιμασίες RIDA®UNITY.

Συνιστάται η παραγωγή κλασμάτων των δειγμάτων για την αποφυγή επαναλαμβανόμενης απόψυξης και κατάψυξης. Τα κατεψυγμένα δείγματα πρέπει να αποψύχονται αμέσως πριν από την απομόνωση, ώστε να αποφευχθεί η αλλοίωση των νουκλεϊκών οξέων.

Ακολουθήστε τις οδηγίες φύλαξης δειγμάτων στους Πίνακες 3 έως 6.

Πίν. 3: Φύλαξη δειγμάτων - Ανίχνευση EHEC

Εγγενή δείγματα - κόπρανα		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 ημέρες	≤ 7 ημέρες	≤ 6 μήνες

Εγγενή δείγματα - καλλιέργεια		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 ημέρα	≤ 1 ημέρα	-

Στο έκλουσμα (από κόπρανα ή καλλιέργεια)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 ώρες	≤ 36 ώρες	≤ 7 ημέρες

Σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C / -80 °C, η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη/απόψυξη του δείγματος κοπράνων έως και 5 φορές δεν επηρεάζει τις ιδιότητες της δοκιμασίας.

Σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C, η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη/απόψυξη του εκλούσματος έως και 3 φορές δεν επηρεάζει τις ιδιότητες της δοκιμασίας.

Μην διατηρείτε καλλιέργειες από κατεψυγμένα κόπρανα καθώς η κατάψυξή τους επηρεάζει σημαντικά τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των παθογόνων και μπορεί πιθανά να προκαλέσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Πίν. 4: Αποθήκευση δειγμάτων - Ανίχνευση STEC

Εγγενή δείγματα - κόπρανα		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 ημέρες	≤ 7 ημέρες	≤ 6 μήνες

Εγγενή δείγματα - καλλιέργεια		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 ημέρα	≤ 1 ημέρα	-

Στο έκλουσμα (από κόπρανα ή καλλιέργεια)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 ώρες	≤ 36 ώρες	≤ 7 ημέρες

Σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C / -80 °C, η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη/απόψυξη του δείγματος κοπράνων έως και 5 φορές δεν επηρεάζει τις ιδιότητες της δοκιμασίας.

Σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C, η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη/απόψυξη του εκλούσματος έως και 3 φορές δεν επηρεάζει τις ιδιότητες της δοκιμασίας.

Μην διατηρείτε καλλιέργειες από κατεψυγμένα κόπρανα καθώς η κατάψυξή τους επηρεάζει σημαντικά τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των παθογόνων και μπορεί πιθανά να προκαλέσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Πίν. 5: Φύλαξη δειγμάτων - Ανίχνευση EPEC

Εγγενή δείγματα - κόπρανα		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 ημέρες	≤ 7 ημέρες	≤ 6 μήνες

Εγγενή δείγματα - καλλιέργεια		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 ημέρα	≤ 1 ημέρα	-

Στο έκλουσμα (από κόπρανα ή καλλιέργεια)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 ώρες	≤ 36 ώρες	≤ 7 ημέρες

Σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C / -80 °C, η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη/απόψυξη του δείγματος κοπράνων έως και 5 φορές δεν επηρεάζει τις ιδιότητες της δοκιμασίας.

Σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C, η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη/απόψυξη του εκλούσματος έως και 3 φορές δεν επηρεάζει τις ιδιότητες της δοκιμασίας.

Μην διατηρείτε καλλιέργειες από κατεψυγμένα κόπρανα καθώς η κατάψυξή τους επηρεάζει σημαντικά τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των παθογόνων και μπορεί πιθανά να προκαλέσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Πίν. 6: Φύλαξη δειγμάτων - Ανίχνευση EIEC/*Shigella* spp.

Εγγενή δείγματα - κόπρανα		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 ημέρα	≤ 7 ημέρες	≤ 6 μήνες

Εγγενές δείγμα - καλλιέργεια		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 1 ημέρα	-

Στο έκλουσμα (από κόπρανα ή καλλιέργεια)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 ώρες	≤ 36 ώρες	≤ 7 ημέρες

Σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C / -80 °C, η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη/απόψυξη του δείγματος κοπράνων έως και 5 φορές δεν επηρεάζει τις ιδιότητες της δοκιμασίας.

Σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C, η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη/απόψυξη του εκλούσματος έως και 3 φορές δεν επηρεάζει τις ιδιότητες της δοκιμασίας.

Μην διατηρείτε καλλιέργειες από κατεψυγμένα κόπρανα καθώς η κατάψυξή τους επηρεάζει σημαντικά τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των παθογόνων και μπορεί πιθανά να προκαλέσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

8.1 Απομόνωση DNA από δείγματα κοπράνων και καλλιέργειες

Για την απομόνωση DNA από δείγματα κοπράνων και καλλιέργειας, χρησιμοποιήστε το kit RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Ακολουθήστε τις ορθές διαδικασίες που περιγράφονται στις οδηγίες χρήσης για το kit RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (Μέρος: Προετοιμασία νουκλεϊκών οξέων από δείγματα κοπράνων· Μέρος: Προετοιμασία νουκλεϊκών οξέων από δείγματα καλλιέργειας).

9. Διεξαγωγή της δοκιμασίας

Τοποθετήστε τόσο τα δείγματα όσο και τα αντιδραστήρια της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC στο σύστημα RIDA®UNITY System στην αρχή κάθε χρήσης.

Εκ των προτέρων, αναμίξτε επαρκώς τα **Reaction Mix**, **Negative Control** και **Positive Control** σε αναδευτήρα vortex. Μην αναμιγνύετε το **Enzyme Mix** σε αναδευτήρα vortex. Κατόπιν, φυγοκεντρήστε σύντομα όλα τα συστατικά.

Οι σωλήνες PCR για τα δείγματα προς εξέταση θα πρέπει να τοποθετούνται εκ των προτέρων στον ενσωματωμένο αναλυτή PCR.

Υπάρχουν διαθέσιμες βάσεις για τη σωστή φόρτωση του συστήματος με αντιδραστήρια και αναλώσιμα. Για τη διαδικασία φόρτωσης, ακολουθήστε τις οδηγίες για το σύστημα RIDA®UNITY. Ακολουθήστε τις οδηγίες στα σχετικά μέρη του εγχειριδίου του συστήματος RIDA®UNITY (Μέρος: Διεξαγωγή κύκλου λειτουργίας).

Η δοκιμασία RIDA®UNITY EHEC/EPEC μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε συνδυασμό με το kit RIDA®UNITY Internal Control Kit. Αυτό επιτρέπει την έγκαιρη αναγνώριση τυχόν αναστολής της PCR, την επαλήθευση της ακεραιότητας του αντιδραστηρίου, και την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων. Η διαδικασία περιγράφεται στις οδηγίες χρήσης του kit εσωτερικού ελέγχου RIDA®UNITY Internal Control Kit (Μέρος: Διεξαγωγή της δοκιμασίας).

Η αυτοματοποιημένη επεξεργασία περιγράφεται στο εγχειρίδιο του συστήματος RIDA®UNITY (Μέρος: Διεξαγωγή κύκλου λειτουργίας).

9.1 Ρυθμίσεις συσκευής

9.1.1 Καθολικό προφίλ για την PCR πραγματικού χρόνου

Για την εναρμόνιση των δοκιμασιών RIDA®UNITY, η δοκιμασία RIDA®UNITY EHEC/EPEC επαληθεύτηκε απόλυτα στο καθολικό προφίλ. Αυτό καθιστά δυνατό τον συνδυασμό των δοκιμασιών DNA και RNA μεταξύ τους. Σε γενικές γραμμές, επομένως, η αντίστροφη μεταγραφή προηγείται στο καθολικό προφίλ.

Πίν. 7: Καθολικό προφίλ της PCR πραγματικού χρόνου για το RIDA®UNITY

<u>Αντίστροφη μεταγραφή</u>	10 λεπτά, 58 °C
Αρχική μετουσίωση	1 λεπτό, 95 °C
Κύκλοι	45 κύκλοι
<u>PCR</u> Μετουσίωση	10 sec, 95 °C
Αναδιάταξη/Επέκταση	15 sec, 60 °C
Ρυθμός μετάβασης/ μεταβολής θερμοκρασίας	Μέγιστος

Σημείωση: Η αναδιάταξη και η επέκταση πραγματοποιούνται στο ίδιο βήμα.

Πίν. 8: Καθολικό προφίλ PCR πραγματικού χρόνου για τον αναλυτή CFX96™ Dx

<u>Αντίστροφη μεταγραφή</u>	10 λεπτά, 58 °C
Αρχική μετουσίωση	1 λεπτό, 95 °C
Κύκλοι	45 κύκλοι
<u>PCR</u> Μετουσίωση	15 sec, 95 °C
Αναδιάταξη/Επέκταση	30 sec, 60 °C
Ρυθμός μετάβασης/ μεταβολής θερμοκρασίας	Μέγιστος

Σημείωση: Η αναδιάταξη και η επέκταση πραγματοποιούνται στο ίδιο βήμα.

9.2 Ρύθμιση καναλιού ανίχνευσης

Πίν. 9: Επιλογή κατάλληλων καναλιών ανίχνευσης

Όργανο PCR πραγματικού χρόνου	Ανίχνευση	Κανάλι ανίχνευσης	Υπόδειξη
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>stx1/stx2</i>	FAM	Κανάλι SEEK stx
	Internal Control	HEX	Κανάλι SEEK ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	Κανάλι SEEK ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	Κανάλι SEEK eae
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>stx1/stx2</i>	FAM	Κανάλι SEEK stx
	Internal Control	VIC	Κανάλι SEEK ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	Κανάλι SEEK ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	Κανάλι SEEK eae

10. Ποιοτικός έλεγχος - ένδειξη αστάθειας ή λήξης των αντιδραστηρίων

Τα δείγματα αξιολογούνται με χρήση του λογισμικού RIDA®SEEK του συστήματος RIDA®UNITY. Το **Negative Control** και **Positive Control** θα πρέπει να εμφανίζουν τα σωστά αποτελέσματα (βλ. Πίν. 9).

Το δείγμα θετικού ελέγχου **Positive Control** παρέχεται σε συγκέντρωση 10^3 αντιγράφων/μL. Χρησιμοποιείται σε συνολική ποσότητα 5×10^3 αντιγράφων σε κάθε αντίδραση PCR.

Το **Negative Control** περιέχει ήδη το δείγμα εσωτερικού ελέγχου RIDA®UNITY Internal Control. Δεδομένου ότι τα δείγματα ελέγχου δεν περιέχουν γενετικό υλικό, δεν αναμένεται σήμα στα κανάλια στόχους. Τα θετικά σήματα στο κανάλι IC με το οποίο ανιχνεύεται το δείγμα εσωτερικού ελέγχου είναι απαραίτητα (βλ. Πίν. 10).

Πίν.10 Για να είναι έγκυρη, μια αντίδραση PCR θα πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

Δείγμα	Αποτέλεσμα	IC Ct	Ct γονιδίου-στόχου
Δείγμα θετικού ελέγχου	+	Δ/Υ*	Βλ. Certificate of Analysis
Δείγμα αρνητικού ελέγχου	-	Ct > 20	0

*Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, το κανάλι IC μπορεί να ανιχνεύει σήμα για το δείγμα θετικού ελέγχου και συνεπώς δεν θα πρέπει να αξιολογείται.

Εάν το δείγμα θετικού ελέγχου δεν εμπίπτει στο ορισμένο εύρος Ct, αλλά το δείγμα αρνητικού ελέγχου είναι έγκυρο, θα πρέπει να αναλύσετε ξανά με PCR όλες τις αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των δειγμάτων ελέγχου.

Εάν το δείγμα αρνητικού ελέγχου δεν είναι αρνητικό, αλλά το δείγμα θετικού ελέγχου είναι έγκυρο, θα πρέπει να αναλύσετε ξανά όλες τις αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των δειγμάτων ελέγχου.

Εάν δεν προκύπτουν οι προσδιοριζόμενες τιμές, ελέγξτε τα παρακάτω στοιχεία πριν επαναλάβετε τη δοκιμασία:

- Ημερομηνία λήξης των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων
- Λειτουργικότητα του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού
- Ορθή διεξαγωγή της δοκιμασίας

Αν οι προϋποθέσεις εξακολουθούν να μην πληρούνται μετά την επανάληψη της δοκιμασίας, επικοινωνήστε με τον κατασκευαστή ή τον τοπικό διανομέα της R-Biopharm.

11. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Η αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνται με το λογισμικό ανάλυσης του συστήματος RIDA®UNITY System, το RIDA®SEEK.

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια διεθνώς αναγνωρισμένη μέθοδος ή κάποιο υλικό αναφοράς για την τυποποίηση. Τα υλικά ελέγχου μπορούν να ιχνηλατηθούν μετρολογικά ως προς τα εσωτερικά πρότυπα της R-Biopharm AG, βάσει συγκεκριμένων αμπλικονίων DNA.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη μετρολογική ιχνηλασιμότητα, επικοινωνήστε με την R-Biopharm AG.

Οι καθορισμένες τιμές, εύρη και επιπλέον λεπτομέρειες βρίσκονται στο Πιστοποιητικό ανάλυσης (Certificate of Analysis, CoA).

Πίν.11: Ερμηνεία αποτελεσμάτων*

Ανίχνευση				
<i>stx1/stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	IC	Αποτέλεσμα
+	-	-	+/-	Ανιχνεύσιμο STEC (EHEC)
-	+	-	+/-	Ανιχνεύσιμο υποείδος EIEC/ <i>Shigella</i> spp.
-	-	+	+/-	Ανιχνεύσιμο EPEC
+	+	-	+/-	Ανιχνεύσιμο STEC (EHEC) και EIEC/υποείδος <i>Shigella</i> spp.
+	-	+	+/-	Ανιχνεύσιμο EHEC
-	+	+	+/-	Ανιχνεύσιμο EIEC/υποείδος <i>Shigella</i> spp. και EPEC
+	+	+	+/-	Ανιχνεύσιμο EHEC και EIEC/υποείδος <i>Shigella</i> spp.
-	-	-	+	Τα γονίδια-στόχος δεν είναι ανιχνεύσιμα
-	-	-	-	Μη έγκυρο αποτέλεσμα

*+= θετικό

- = αρνητικό

Ο Νόμος περί προστασίας από λοιμώξεις (IfSG) περιγράφει το στέλεχος EHEC ως στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* που παράγει τοξίνη Shiga (STEC) το οποίο είναι παθογόνος παράγοντας για τον άνθρωπο. Καθώς επί του παρόντος δεν μπορεί να καθιερωθεί ακριβής ορισμός για το παθογόνο για τον άνθρωπο στέλεχος STEC, **κάθε** στέλεχος STEC θεωρείται πιθανό EHEC.⁽⁵⁾

Ένα δείγμα θεωρείται θετικό εάν το DNA του δείγματος και το δείγμα εσωτερικού ελέγχου **Internal Control** εμφανίζουν σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης.

Ένα δείγμα θεωρείται επίσης θετικό εάν το DNA του δείγματος εμφανίζει σήμα ενίσχυσης, αλλά δεν εμφανίζεται σήμα ενίσχυσης για το **Internal Control** στο σύστημα ανίχνευσης. Η ανίχνευση του δείγματος εσωτερικού ελέγχου **Internal Control** δεν είναι απαραίτητη σε αυτή την περίπτωση, επειδή οι υψηλές συγκεντρώσεις αμπλικονίου μπορεί να οδηγήσουν σε ασθενές σήμα ή απουσία σήματος του δείγματος εσωτερικού ελέγχου **Internal Control**.

Ένα δείγμα θεωρείται αρνητικό εάν το DNA του δείγματος δεν εμφανίζει σήμα ενίσχυσης, αλλά εμφανίζεται σήμα ενίσχυσης για το δείγμα εσωτερικού ελέγχου **Internal Control** στο σύστημα ανίχνευσης. Η πιθανότητα αναστολής της αντίδρασης PCR μπορεί να αποκλειστεί με την ανίχνευση του δείγματος εσωτερικού ελέγχου **Internal Control**.

Ένα δείγμα είναι άκυρο εάν το DNA του δείγματος και το δείγμα εσωτερικού ελέγχου **Internal Control** δεν εμφανίζουν σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης. Υπάρχουν αναστολείς PCR στο δείγμα, ή παρουσιάστηκε σφάλμα κατά τη διαδικασία απομόνωσης.

12. Περιορισμοί της μεθόδου

1. Η δοκιμασία RIDA®UNITY EHEC/EPEC ανιχνεύει το DNA για τους παράγοντες λοιμοτοξικότητας των EHEC, STEC, EPEC, και EIEC/*Shigella* spp. σε μη επεξεργασμένα δείγματα ανθρώπινων κοπράνων και καλλιέργειας. Δεν μπορεί να συναχθεί συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου της προσδιορισμένης τιμής Ct και της εμφάνισης σοβαρών κλινικών συμπτωμάτων από αυτήν τη μέθοδο. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν πρέπει πάντα να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με τα πλήρη κλινικά συμπτώματα.
2. Η διάγνωση δεν θα πρέπει να βασίζεται μόνο στο αποτέλεσμα της μοριακής βιολογικής ανάλυσης, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται πάντα υπόψη το ιατρικό ιστορικό και τα συμπτώματα του ασθενούς.
3. Αυτή η δοκιμασία έχει εγκριθεί μόνο για την αυτοματοποιημένη επεξεργασία με χρήση του συστήματος RIDA®UNITY.
4. Αυτή η δοκιμασία έχει εγκριθεί μόνο για δείγματα κοπράνων και καλλιέργειας.
5. Κατά τη χρήση της μήτρας καλλιέργειας, μη μεταφέρετε το θρεπτικό μέσο που περιέχει άγαρ στην αντίδραση PCR καθώς μπορεί να προκαλέσει παρεμβολές.
6. Η ακατάλληλη δειγματοληψία, μεταφορά, φύλαξη και ο ακατάλληλος χειρισμός ή ένα φορτίο παθογόνου χαμηλότερο από την αναλυτική ευαισθησία της δοκιμασίας μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.
7. Η παρουσία αναστολέων PCR μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά ή άκυρα αποτελέσματα.
8. Όπως συμβαίνει με όλες τις διαγνωστικές δοκιμασίες *in vitro* που βασίζονται σε PCR, μπορούν να ανιχνευθούν εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις των αλληλουχιών-στόχων που βρίσκονται χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης (LoD 95 %). Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται δεν είναι πάντα αναπαραγώγιμα.
9. Μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί στις θέσεις πρόσδεσης του εκκινητή ή του ανιχνευτή μπορεί να επηρεάσουν την ανίχνευση νέων ή άγνωστων παραλλαγών και μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με χρήση του RIDA®UNITY EHEC/EPEC.
10. Ένα θετικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας δεν υποδηλώνει απαραίτητα την παρουσία βιώσιμων οργανισμών. Ένα θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι είναι παρόντα τα γονίδια στόχοι (EHEC, *stx1/2*, *eae* STEC, *stx1/2*· EPEC, *eae*· και EIEC/*Shigella* spp., *ipaH*) .
11. Αυτός ο προσδιορισμός θα πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τους κανονισμούς ορθής εργαστηριακής πρακτικής (ΟΕΠ). Κατά την πραγματοποίηση της δοκιμασίας οι χρήστες θα πρέπει να ακολουθούν με ακρίβεια τις οδηγίες του κατασκευαστή.

13. Χαρακτηριστικά επιδόσεων

13.1 Χαρακτηριστικά κλινικών επιδόσεων

Το RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR συγκρίθηκε σε εξωτερικό εργαστήριο με μια δοκιμασία αναφοράς με σήμανση CE που βασίστηκε στην ανάλυση 276 δειγμάτων κοπράνων από ασθενείς με συμπτώματα λοίμωξης του γαστρεντερικού συστήματος.

Τα αποτελέσματα δείχνουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση των παραγόντων λοιμοτοξικότητας των EHEC, STEC, EPEC, και EIEC/*Shigella* spp. κατά τη χρήση του kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC kit.

Πίν. 12: Ανίχνευση *stx1/2* - δείγματα κοπράνων

		PCR αναφοράς		Σύνολο
		Θετικό	Αρνητικό	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>stx1/2</i>	Θετικό	122	0	122
	Αρνητικό	5	149	154
	Σύνολο	127	149	276

Σχετική ευαισθησία (95 % CI)	96,1 % (91,1 % - 98,7 %)
Σχετική ειδικότητα (95 % CI)	100 % (97,6 % - 100 %)

Πίν. 13: Ανίχνευση *ipaH* - δείγματα κοπράνων

		PCR αναφοράς		Σύνολο
		Θετικό	Αρνητικό	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>ipaH</i>	Θετικό	65	0	65
	Αρνητικό	0	211	211
	Σύνολο	65	211	276

Σχετική ευαισθησία (95 % CI)	100 % (94,5 % - 100 %)
Σχετική ειδικότητα (95 % CI)	100 % (98,3 % - 100 %)

Πίν. 14: Ανίχνευση *eae* - δείγματα κοπράνων

		PCR αναφοράς		Σύνολο
		Θετικό	Αρνητικό	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>eae</i>	Θετικό	179	0	179
	Αρνητικό	4	93	97
	Σύνολο	183	93	276

Σχετική ευαισθησία (95 % CI)	97,8 % (94,5 % - 100 %)
Σχετική ειδικότητα (95 % CI)	100 % (96,1 % - 100 %)

13.2 Χαρακτηριστικά επιδόσεων ανάλυσης

13.2.1 Όριο ανίχνευσης (LoD 95 %)

Για τον προσδιορισμό του LoD, μετρήθηκε ένα δείγμα θετικού ελέγχου (αρνητικά δείγματα κοπράνων, ενισχυμένα, ή δείγμα από καλλιέργεια) σε πέντε βήματα αραίωσης (σε βήματα της τάξης του 0,25 της λογαριθμικής κλίμακας) για κάθε στόχο, με 20 επαναλήψεις ανά βήμα, σε μία παρτίδα. Ακολούθησε ανάλυση probit. Στη συνέχεια, το υπολογισμένο LoD επιβεβαιώθηκε με 20 επαναλήψεις ανά στόχο για την υπολογισμένη συγκέντρωση βήματος/αραίωσης.

Για τη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα στελέχη:

- *stx1/stx2: Escherichia coli* D3509 (Το LoD για το *stx2* προσδιορίστηκε επειδή το γονίδιο *stx2* σχετίζεται με το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο.)
- *ipaH: Escherichia coli* Fr1368
- *eae: Escherichia coli* DSM8695

Για την ανίχνευση του DNA των EHEC, STEC, EPEC, και EIEC/*Shigella* spp. με χρήση της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC στο σύστημα UNITY, προσδιορίστηκαν τα παρακάτω όρια ανίχνευσης (LoD).

Τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Πίν. 15: Αποτελέσματα για το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC για τα γονίδια στόχους *stx1/2*, *ipaH*, και *eae*.

	Μήτρα	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Κόπρανα	476.000 CFU/mL	5.300 CFU/mL	125.000 CFU/mL
	Καλλιέργεια	2.130 CFU/mL	798 CFU/mL	2.890 CFU/mL

*CFU: Μονάδα σχηματισμού αποικιών (Colony Forming Units)

Το LoD για τα *stx1/2* σε δείγματα κοπράνων προσδιορίστηκε στα 476.000 CFU/mL.

Το LoD για το *ipaH* σε δείγματα κοπράνων προσδιορίστηκε στα 5.300 CFU/mL.

Το LoD για το *eae* σε δείγματα κοπράνων προσδιορίστηκε στα 125.000 CFU/mL.

Το LoD για τα *stx1/2* σε δείγματα καλλιέργειας προσδιορίστηκε στα 2.130 CFU/mL.

Το LoD για το *ipaH* σε δείγματα καλλιέργειας προσδιορίστηκε στα 798 CFU/mL.

Το LoD για το *eae* σε δείγματα καλλιέργειας προσδιορίστηκε στα 2.890 CFU/mL.

Για τη βελτιωμένη ροή εργασιών με χρήση του αναλυτή CFX96™ Dx, αυτές οι τιμές LoD επιβεβαιώθηκαν για ένα εύρος 2-3 φορές πολλαπλάσιο του LoD.

13.2.2 Αναλυτική ειδικότητα

Παρεμποδίζουσες ουσίες

Η παρουσία αναστολέων της PCR και παρεμποδίζουσων ουσιών μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά ή άκυρα αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις διαφόρων ουσιών που μπορεί να υπάρχουν λόγω της ευρείας χρήσης τους για γαστρεντερικές λοιμώξεις ή της ευρείας εμφάνισης στα αντίστοιχα δείγματα.

Οι ουσίες που θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα των δοκιμασιών εξετάστηκαν αρχικά σε υψηλές συγκεντρώσεις (τρεις φορές την ημερήσια δόση ή προσομοίωση της χειρότερης περίπτωσης) σε έναν έλεγχο παρεμβολών.

Δεν εντοπίστηκαν παρεμβολές για τις ουσίες που παρατίθενται στον Πίνακα 16.

Πίν. 16: Πιθανώς παρεμποδίζουσες ουσίες

Πιθανώς παρεμποδίζουσα ουσία	Συγκέντρωση
Azithromycin-ratiopharm® επικαλυμμένα με λεπτό υμένιο δισκία των 500 mg (azithromycin)	0,75 % [w/v]
Θειικό βάριο	18,5 % [v/v]
Cologran® υγρό γλυκαντικό (σακχαρίνη + κυκλαμικό άλας)	1,3 % [w/v]
Ανθρώπινο αίμα	5 % [v/v]
Δισκία ενεργού άνθρακα των 250 mg (ενεργός άνθρακας)	6 % [w/v]
Loperamid-ratiopharm® akut (λοπεραμίδη)	0,02 % [v/v]
Βλεννίνες	5 % [w/v]
Στεατικό/παλμιτικό οξύ	40 % [w/v]

Διασταυρούμενες αντιδράσεις

Διερευνήθηκαν διάφοροι οργανισμοί (βακτήρια, παράσιτα, μύκητες και ιοί) που βρίσκονται συνήθως στη μήτρα κοπράνων. Οι μικροοργανισμοί προς διερεύνηση για αυτήν τη δοκιμασία επιλέχθηκαν είτε λόγω της φυσικής εμφάνισής τους σε δείγματα κοπράνων είτε λόγω πρόκλησης αντίστοιχων συμπτωμάτων ως γαστρεντερικά παθογόνα. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακές καλλιέργειες (μεταξύ 10^6 και 10^9 CFU/mL), καλλιέργειες μυκήτων ή ιών, υπερκείμενα ιικών καλλιέργειών, απομονωμένα στελέχη και πρότυπα LGC για τους αντίστοιχους οργανισμούς.

Το RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR είναι ειδικό για τα EHEC, STEC, EPEC, και EIEC/*Shigella* spp. Δεν ανιχνεύθηκαν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα παρακάτω είδη (βλ. Πίν. 17):

Πίν. 17: Οργανισμοί που μπορεί να οδηγήσουν σε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα.

Οργανισμός	Αποτέλεσμα δοκιμασίας*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adenovirus 40	-	-	-
Adenovirus 41, ανθρώπινος, στέλεχος Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
Astrovirus 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
Υποείδος <i>Campylobacter fetus fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
Υποείδος <i>Campylobacter lari 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> ** στέλεχος Portland 1	-	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** WB Κλώνος 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>	-	-	-

* - = αρνητικό

** Οι ονομασίες *Giardia intestinalis* και *Giardia lamblia* αναφέρονται στον ίδιο οργανισμό.

13.2.3 Ακρίβεια

Η ακρίβεια της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR προσδιορίστηκε για τα ακόλουθα επίπεδα εξέτασης.

Ακρίβεια εντός του ίδιου προσδιορισμού (*Intra-Assay*): Προσδιορισμός 5 δειγμάτων ελέγχου με 20 επαναλήψεις για το καθένα σε RIDA®UNITY, υπό τις ίδιες συνθήκες.

Ακρίβεια μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών (*Inter-Assay*): Προσδιορισμός 5 δειγμάτων ελέγχου σε 20 αναλύσεις εις διπλούν σε 10 εργάσιμες ημέρες (2 αναλύσεις ανά ημέρα), που διενεργήθηκε από διαφορετικούς τεχνικούς υπό αναπαραγώγιμες συνθήκες.

Η δοκιμασία για ακρίβεια *intra-assay* και *inter-assay* διενεργήθηκε με χρήση τριών διαφορετικών παρτίδων.

Οι συντελεστές διακύμανσης που προέκυψαν για κάθε μέτρηση με χρήση της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR στους αναλυτές RIDA®UNITY και CFX96™ Dx ήταν 4,29 %.

Πίν. 18: Αποτελέσματα για την ακρίβεια της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC για τα *stx1/2* σε δείγματα κοπράνων (σύστημα RIDA®UNITY System).

Ct	Μέση τιμή / ΣΔ	<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>
		Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1-3
1	Ct	27,8	27,7	27,4	27,8	27,7	27,6	27,7
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	1,72 %	1,35 %	1,46 %	3,29 %	2,85 %	3,15 %	3,10 %
4	Ct	-	-	-	32,0	31,7	31,6	31,8
	ΣΔ (%)	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	2,15 %	2,23 %	2,26 %	2,28 %
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	ΣΔ (%)	2,34 %	2,05 %	2,13	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ

Πίν. 19: Αποτελέσματα για την ακρίβεια της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC για τα *stx1/2* σε δείγματα κοπράνων (αναλυτής CFX96™ Dx).

Ct	Μέση τιμή / ΣΔ	<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>
		Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1-3
1	Ct	27,2	27,1	26,9	26,1	26,0	26,0	26,0
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	2,34 %	0,74 %	0,95 %	4,29 %	3,11 %	2,91 %	3,54 %
4	Ct	-	-	-	29,2	28,7	28,6	28,9
	ΣΔ (%)	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	2,96 %	2,90 %	2,76 %	3,04 %
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	ΣΔ (%)	1,52 %	1,59 %	3,43 %	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ

Πίν. 20: Αποτελέσματα για την ακρίβεια της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC για το *ipaH* σε δείγματα κοπράνων (σύστημα RIDA®UNITY System).

Ct	Μέση τιμή / ΣΔ	Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1-3
1	Ct	25,0	24,8	24,6	25,3	25,1	25,1	25,2
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	0,96 %	0,99 %	0,87 %	1,72 %	1,57 %	1,53 %	1,61 %
4	Ct	-	-	-	27,1	27,0	27,0	27,0
	ΣΔ (%)	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	1,44 %	1,34 %	1,45 %	1,42 %
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	ΣΔ (%)	0,88 %	0,77 %	0,69 %	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ

Πίν. 21: Αποτελέσματα για την ακρίβεια της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC για το *ipaH* σε δείγματα κοπράνων (αναλυτής CFX96™ Dx).

Ct	Μέση τιμή / ΣΔ	Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1-3
1	Ct	25,1	25,0	24,8	24,4	24,4	24,4	24,4
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	1,04 %	1,09 %	1,14 %	1,29 %	1,46 %	1,53 %	1,43 %
4	Ct	-	-	-	26,2	26,1	26,1	26,2
	ΣΔ (%)	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	1,27 %	1,45 %	1,36 %	1,36 %
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	ΣΔ (%)	0,89 %	0,53 %	0,70 %	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ

Πίν. 22: Αποτελέσματα για την ακρίβεια της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC για το eae σε δείγματα κοπράνων (σύστημα RIDA®UNITY System).

Ct	Μέση τιμή / ΣΔ	<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>
		Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1-3
1	Ct	26,2	26,3	26,0	26,4	26,5	26,5	26,5
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	1,05 %	0,86 %	0,99 %	2,03 %	1,84 %	1,80 %	1,89 %
4	Ct	-	-	-	28,9	29,1	29,1	29,0
	ΣΔ (%)	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	1,81 %	1,78 %	1,81 %	1,80 %
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	ΣΔ (%)	1,24 %	0,78 %	1,18 %	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ

Πίν. 23: Αποτελέσματα για την ακρίβεια της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC για το eae σε δείγματα κοπράνων (αναλυτής CFX96™ Dx).

Ct	Μέση τιμή / ΣΔ	<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>
		Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1	Παρτίδα ΚΙΤ 2	Παρτίδα ΚΙΤ 3	Παρτίδα ΚΙΤ 1-3
1	Ct	26,5	26,6	26,5	26,3	26,4	26,4	26,4
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	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
	ΣΔ (%)	0,88 %	0,74 %	0,79 %	1,66 %	1,78 %	1,85 %	1,77 %
4	Ct	-	-	-	28,5	28,7	28,6	28,6
	ΣΔ (%)	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	1,32 %	1,58 %	1,48 %	1,47 %
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	ΣΔ (%)	0,73 %	0,55 %	0,68 %	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ	Δ/Υ

13.2.4 Αναλυτική αντιδραστικότητα

Η αντιδραστικότητα της δοκιμασίας RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR ελέγχθηκε σε προκαθορισμένο πάνελ στελεχών *E. coli* και *Shigella* (βλ. Πίν. 24).

Πίν. 24: Αναλυτική δοκιμασία αντιδραστικότητας

Στέλεχος	Αποτέλεσμα*		
	<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>	-	+	-

*+ = θετικό (τουλάχιστον 2 από τις 3 επαναλήψεις θετικές)










- = αρνητικό

14. Ιστορικό εκδόσεων





Αριθμός έκδοσης	Ενότητα και ονομασία
2022-06-14	Έκδοση του συστήματος

15. Επεξήγηση συμβόλων

Γενικά σύμβολα

	Για διαγνωστική <i>in vitro</i> χρήση
	Ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης
	Αριθμός παρτίδας
	Χρήση πριν από
	Θερμοκρασία φύλαξης
	Κωδικός προϊόντος
	Αριθμός δοκιμασιών
	Ημερομηνία παραγωγής
	Κατασκευαστής

Ειδικά σύμβολα δοκιμασίας

	Μείγμα αντίδρασης
	Μείγμα ενζύμων
	Δείγμα αρνητικού ελέγχου
	Δείγμα θετικού ελέγχου

16. Παραπομπές

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).