

RIDA® UNITY EHEC/EPEC

REF UN2205



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

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



1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il test RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC, eseguito sulla piattaforma RIDA[®]UNITY, è una PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta del DNA dei fattori di virulenza di EHEC, STEC, EPEC ed EIEC/*Shigella* spp. in campioni fecali umani non trattati e campioni di coltura provenienti da soggetti con segni e sintomi di gastroenterite acuta.

Il test RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC è destinato a supportare la diagnosi differenziale delle infezioni da *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC ed EIEC/*Shigella* spp.) in pazienti con sintomi di gastroenterite in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC o EIEC/*Shigella* spp.) e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

2. Sintesi e spiegazione del test

Le malattie diarroiche sono un problema sanitario significativo e causano circa 1,7 miliardi di casi all'anno nei bambini di tutto il mondo ⁽¹⁾. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), con circa 525.000 morti all'anno, queste malattie sono la seconda causa di morte nei bambini sotto i 5 anni di età, soprattutto nei paesi in via di sviluppo ⁽¹⁾. Uno dei patogeni batterici più comuni delle malattie diarroiche è l'*Escherichia coli* ⁽²⁾.

L'*E. coli* è un batterio Gram-negativo, fermentante il lattosio e mobile, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. È un normale abitante del tratto gastrointestinale, ma può anche causare malattie diarroiche con elevata morbilità e mortalità nei bambini, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. Le seguenti classi di *E. coli* diarroici sono state identificate in base alle caratteristiche di virulenza, all'epidemiologia e alle manifestazioni cliniche del batterio: *E. coli* enteropatogeni (EPEC), *E. coli* enterotossigeni (ETEC), *E. coli* enteroemorragici (EHEC), *E. coli* enteroinvasivi (EIEC) ed *E. coli* enteroaggregativi (EAEC). Tutti questi patotipi diarroici di *E. coli* possono essere trasmessi per via oro-fecale ⁽³⁾.

Tra gli *E. coli* patogeni intestinali, gli *E. coli* enteroemorragici (EHEC) hanno acquisito particolare importanza. Sono un sottogruppo degli *E. coli* produttori di tossina Shiga o di verotossina (rispettivamente STEC o VTEC). La patogenicità degli STEC può essere ricondotta alla loro capacità di colonizzare l'intestino aderendo alle cellule dell'epitelio intestinale. Dopo la colonizzazione, i batteri sono in grado di produrre due citotossine, le verotossine 1 e 2. Data la stretta somiglianza delle verotossine con le tossine Shiga di *Shigella dysenteriae*, i VTEC sono anche chiamati STEC. Altri importanti fattori diagnostici di patogenicità degli EHEC sono non solo *stx1/stx2* (geni della tossina Shiga), ma anche il gene *eae* (il gene di adesione e scomparsa di *E. coli*), che codifica l'intimina, una proteina di membrana. Questa proteina di membrana è responsabile dell'adesione del patogeno alle cellule epiteliali intestinali ⁽⁴⁾. I sintomi clinici che possono essere causati da EHEC/STEC nell'uomo vanno dalla diarrea sanguinolenta alla sindrome emolitico-uremica (SEU) ^(2, 5). Le

fonti di infezione sono principalmente gli alimenti contaminati, mentre sono sufficienti meno di 1.000 batteri per causare un'infezione da EHEC/STEC. Il peggior focolaio alimentare causato da STEC in Germania risale al 2011. Questo focolaio ha provocato 3.816 infezioni da STEC identificate e 54 decessi, di cui 32 associati a SEU ⁽⁵⁾.

Gli *E. coli* enteropatogeni (EPEC) sono noti come causa di malattie diarroiche pediatriche, soprattutto nei paesi in via di sviluppo ⁽³⁾. Gli EPEC si distinguono dagli EHEC per l'assenza di tossine Shiga ⁽³⁾. I sintomi più comuni associati a un'infezione da EPEC sono diarrea acquosa, dolore addominale, nausea, vomito e febbre, mentre la dose infettiva negli adulti sani è di circa 10^8 organismi ⁽⁵⁾.

E. coli enteroinvasivi (EIEC) e *Shigella* spp. sono anch'essi causa di malattie diarroiche in tutto il mondo, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. Sono entrambi batteri Gram-negativi, strettamente correlati tra loro a livello biochimico e genetico ⁽⁶⁾. La patogenicità di EIEC e *Shigella* spp. è legata all'invasione delle cellule dell'epitelio intestinale mediata dal plasmide e alla loro distruzione. Responsabili di questo processo sono i prodotti del gene *ipaH* (invasive plasmid antigen H). Questo gene è importante per la rivelazione di EIEC/*Shigella* spp., rendendo quindi possibile distinguere questo patotipo da EHEC. Si ritiene che i focolai di infezioni da EIEC/*Shigella* spp. siano principalmente causati da alimenti e si manifestino con diarrea, dolori addominali, nausea e febbre ⁽⁶⁾.

3. Principio del test

Il test RIDA®UNITY EHEC/EPEC è una PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e la differenziazione dei geni del fattore di virulenza di EHEC, STEC, EPEC, EIEC/*Shigella* spp. in campioni di feci umane e di coltura. La processazione è completamente automatizzata con il sistema RIDA®UNITY. In primo luogo, gli acidi nucleici vengono estratti utilizzando il RIDA®UNITY Universal Extraction Kit e l'Internal Control Kit.

La sequenza target viene sempre rivelata mediante RT-PCR real-time in una singola fase (anche con i test del DNA): la trascrizione inversa (RT) e la successiva PCR sono eseguite nella medesima cuvetta di reazione. Nel processo, l'RNA isolato (se presente) viene trascritto in cDNA con l'ausilio di una trascrittasi inversa. I frammenti genici specifici dei fattori di virulenza *stx1/stx2*, *eae* e *ipaH* vengono quindi amplificati mediante PCR real-time.

Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target, le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione,

la Taq Polymerase separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica di uno strumento di PCR real-time. Il segnale fluorescente aumenta con la quantità di ampliconi formati.

Contemporaneamente, deve essere utilizzato il RIDA®UNITY Internal Control Kit per poter verificare la preparazione del campione e/o la potenziale inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni *.

Tabella 1: Contenuto della confezione

RIF	Reagente	Quantità		Colore del tappo
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 x	1935 µL	giallo, pronto per l'uso
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 x	350 µL	rosso, pronto per l'uso
UNZ2205PC	Positive Control	1 x	200 µL	blu, pronto per l'uso
UNZ2205NC	Negative Control	1 x	450 µL	bianco, pronto per l'uso

* Con un utilizzo ripetuto e in serie più piccole, il numero di reazioni può ridursi.

5. Istruzioni di conservazione

- Seguire le linee guida per la manipolazione contenute nella Tabella 2 e riporre il kit immediatamente dopo l'uso attenendosi alle informazioni specificate.
- I reagenti devono essere conservati lontano dalla luce, a una temperatura compresa fra -16 °C e -28 °C e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. La garanzia di qualità non è più valida dopo la data di scadenza.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con attenzione prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2–8 °C).
- Cicli di congelamento e scongelamento ripetuti fino a 8 volte non influenzano le proprietà del test.

Tabella 2: Condizioni di conservazione e informazioni

	Temperatura di conservazione	Tempo massimo di conservazione
prima dell'apertura	da -16 °C a -28 °C	Utilizzabile fino alla data di scadenza indicata
dopo l'apertura	da -16 °C a -28 °C	8 cicli di congelamento e scongelamento

6. Reagenti necessari ma non forniti

Il test di RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR è destinato esclusivamente all'uso con il sistema RIDA®UNITY. Per un corretto utilizzo sono indispensabili i seguenti prodotti:

6.1 Reagenti

Per eseguire il test RIDA®UNITY EHEC/EPEC occorrono i seguenti reagenti:

Reagenti	Numero di catalogo
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Attrezzatura di laboratorio

Per eseguire il test RIDA®UNITY EHEC/EPEC occorre la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Sistema RIDA®UNITY; numero di catalogo: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Materiali di consumo RIDA®UNITY (puntali, piastre, cuvette di reazione, pellicole). Consultare le istruzioni per l'uso del sistema RIDA®UNITY, informazioni per l'ordine dei materiali di consumo.
Agitatore a vortice
Centrifuga da tavolo
Guanti monouso senza talco

Ciclatore esterno (possibile potenziamento del sistema)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Il kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC può essere utilizzato insieme ad altri ciclatori compatibili. Gli strumenti alternativi per la PCR real-time devono essere verificati/convalidati dall'utente. Contattare R-Biopharm AG all'indirizzo pcr@r-biopharm.de per verificare la compatibilità.

7. Avvertenze e misure precauzionali

Uso per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.

Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.

Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.

Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

Evitare di contaminare i campioni e i componenti del kit con microbi e nucleasi (DNasi/RNasi).

I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.

Non scambiare o mescolare i componenti (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) di un lotto di un kit con i componenti di un altro lotto.

Il kit di test può essere utilizzato per 8 settimane dalla prima apertura (può essere ricaricato fino a 6 volte). Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Queste specifiche sono controllate anche dal sistema RIDA[®]UNITY.

Gli operatori sono tenuti al corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Ulteriori dettagli sulla scheda di dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) sono disponibili cercando il codice articolo alla pagina

<https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Per gli utenti nell'Unione europea: segnalare tutti gli eventi avversi gravi associati al prodotto a R-Biopharm AG e alle autorità nazionali competenti.

La sintesi sulla sicurezza e le prestazioni (SSP) di questo prodotto sarà disponibile su <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> una volta avviato il database europeo sui dispositivi medici (EUDAMED). Nel database, cercare il dispositivo usando l'UDI-DI che si trova sull'imballaggio esterno del dispositivo.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Per ottenere le migliori prestazioni possibili dal test RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC, si raccomanda di utilizzare materiale campione fresco.

Evitare di congelare e scongelare ripetutamente il campione.

Evitare l'uso di terreni di trasporto contenenti conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti o detergenti in quanto queste sostanze potrebbero creare interferenze con i test RIDA[®]UNITY.

Si raccomanda di produrre aliquote dei campioni per evitare ripetuti scongelamenti e congelamenti. I campioni congelati devono essere scongelati immediatamente prima dell'estrazione per evitare la degradazione degli acidi nucleici.

Seguire le istruzioni per la conservazione dei campioni nelle Tabelle 3-6.

Tabella 3: Conservazione dei campioni - rivelazione di EHEC

Campioni nativi - feci		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 giorni	≤ 7 giorni	≤ 6 mesi

Campioni nativi - coltura		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 giorno	≤ 1 giorno	-

Nell'eluato (da feci o coltura)		
30 °C	2-8 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

Se la conservazione avviene a -20 °C / -80 °C, il congelamento e scongelamento del campione di feci ripetuto per un massimo di 5 volte non influisce sulle proprietà del test.

Se la conservazione avviene a -20 °C, il congelamento e scongelamento dell'eluato (da feci o coltura) ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test.

Non coltivare le colture da feci precedentemente congelate perché il congelamento influisce pesantemente sulle caratteristiche di crescita degli agenti patogeni e questo può potenzialmente causare risultati falsi negativi.

Tabella 4: Conservazione dei campioni - rivelazione di STEC

Campioni nativi - feci		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 giorni	≤ 7 giorni	≤ 6 mesi

Campioni nativi - coltura		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 giorno	≤ 1 giorno	-

Nell'eluato (da feci o coltura)		
30 °C	2–8 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

Se la conservazione avviene a -20 °C / -80 °C, il congelamento e scongelamento del campione di feci ripetuto per un massimo di 5 volte non influisce sulle proprietà del test.

Se la conservazione avviene a -20 °C, il congelamento e scongelamento dell'eluato (da feci o coltura) ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test.

Non coltivare le colture da feci precedentemente congelate perché il congelamento influisce pesantemente sulle caratteristiche di crescita degli agenti patogeni e questo può potenzialmente causare risultati falsi negativi.

Tabella 5: Conservazione dei campioni - rivelazione di EPEC

Campioni nativi - feci		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 giorni	≤ 7 giorni	≤ 6 mesi

Campioni nativi - coltura		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 giorno	≤ 1 giorno	-

Nell'eluato (da feci o coltura)		
30 °C	2–8 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

Se la conservazione avviene a -20 °C / -80 °C, il congelamento e scongelamento del campione di feci ripetuto per un massimo di 5 volte non influisce sulle proprietà del test.

Se la conservazione avviene a -20 °C, il congelamento e scongelamento dell'eluato (da feci o coltura) ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test.

Non coltivare le colture da feci precedentemente congelate perché il congelamento influisce pesantemente sulle caratteristiche di crescita degli agenti patogeni e questo può potenzialmente causare risultati falsi negativi.

Tabella 6: Conservazione dei campioni - rivelazione di EIEC/*Shigella* spp.

Campioni nativi - feci		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 giorno	≤ 7 giorni	≤ 6 mesi

Campione nativo - coltura		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 1 giorno	-

Nell'eluato (da feci o coltura)		
30 °C	2–8 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

Se la conservazione avviene a -20 °C / -80 °C, il congelamento e scongelamento del campione di feci ripetuto per un massimo di 5 volte non influisce sulle proprietà del test.

Se la conservazione avviene a -20 °C, il congelamento e scongelamento dell'eluato (da feci o coltura) ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test.

Non coltivare le colture da feci precedentemente congelate perché il congelamento influisce pesantemente sulle caratteristiche di crescita degli agenti patogeni e questo può potenzialmente causare risultati falsi negativi.

8.1 Preparazione del DNA da campioni di feci e di coltura

Per isolare il DNA da campioni di feci e di coltura, utilizzare il RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Seguire le procedure indicate nelle istruzioni per l'uso del RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (sezione: Preparazione dell'acido nucleico da campioni fecali; sezione: Preparazione dell'acido nucleico da campioni di coltura).

9. Esecuzione del test

All'inizio dell'utilizzo, posizionare sia i campioni sia i reagenti del kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC sul sistema RIDA®UNITY.

Prima di procedere, mescolare adeguatamente **Reaction Mix**, **Negative Control** e **Positive Control** utilizzando un agitatore a vortice. Non agitare l'**Enzyme Mix**. Successivamente, centrifugare brevemente tutti i componenti.

Le provette PCR per i campioni da esaminare devono essere posizionate preventivamente nel ciclatore PCR integrato.

Per caricare correttamente il sistema con i reagenti e i materiali di consumo sono disponibili dei supporti. Per il processo di caricamento, seguire le istruzioni del sistema RIDA®UNITY. Osservare le sezioni pertinenti del manuale del sistema RIDA®UNITY (sezione: Esecuzione di un ciclo).

Il test RIDA®UNITY EHEC/EPEC può essere utilizzato solo in combinazione con il RIDA®UNITY Internal Control Kit. Questo consente di riconoscere tempestivamente la potenziale inibizione della PCR, di verificare l'integrità del reagente e di confermare l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. La procedura è descritta nelle istruzioni per l'uso del RIDA®UNITY Internal Control Kit (sezione: Esecuzione del test).

La processazione automatizzata è descritta nel manuale del sistema RIDA®UNITY (sezione: Esecuzione di un ciclo).

9.1 Impostazioni del dispositivo

9.1.1 Profilo PCR real-time universale

Per armonizzare i test RIDA®UNITY, il test RIDA®UNITY EHEC/EPEC è stato verificato esclusivamente nel profilo universale. Questo rende possibile combinare tra loro i test del DNA e dell'RNA. In generale, quindi, la trascrizione inversa è il primo passaggio del profilo universale.

Tabella 7: Profilo universale di PCR real-time per RIDA®UNITY

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

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

Tabella 8: Profilo di PCR real-time universale per CFX96™ Dx

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

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

9.2 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Nota
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>stx1/stx2</i>	FAM	Canale SEEK stx
	Internal Control	HEX	Canale SEEK ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	Canale SEEK ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	Canale SEEK eae
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>stx1/stx2</i>	FAM	Canale SEEK stx
	Internal Control	VIC	Canale SEEK ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	Canale SEEK ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	Canale SEEK eae

10. Controllo qualità – indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

I campioni vengono valutati con il software di analisi RIDA®SEEK del sistema RIDA®UNITY. Perché l'esecuzione sia valida, **Negative Control** e **Positive Control** devono mostrare i risultati corretti (vedere Tabella 9).

Il **Positive Control** è presente a una concentrazione di 10^3 copie/ μ L. Viene utilizzato in una quantità totale di 5×10^3 copie in ogni ciclo di PCR.

Il **Negative Control** contiene già il RIDA®UNITY Internal Control. Poiché i controlli non contengono un modello, non devono essere previsti segnali nei canali target. È indispensabile la presenza di segnali positivi nel canale IC con cui viene rivelato il controllo interno (vedere Tabella 10).

Tabella 10: Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	Risultato	Ct IC	Ct gene target
Controllo positivo	+	non disponibile *	Vedere il Certificate of Analysis.
Controllo negativo	-	Ct > 20	0

* In alcune circostanze, il canale IC può avere un segnale positivo nel controllo positivo e quindi non deve essere valutato.

Se il controllo positivo non rientra nell'intervallo Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, tutte le reazioni, compresi i controlli, devono essere rianalizzate nella PCR.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, tutte le reazioni, compresi i controlli, devono essere rianalizzate nella PCR.

Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare quanto segue:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata
- Correttezza della procedura di esecuzione del test

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo aver ripetuto il test, rivolgersi al fabbricante o al proprio distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

La valutazione e l'interpretazione del campione avvengono utilizzando RIDA®SEEK, il software di analisi del sistema RIDA®UNITY.

Non esiste un metodo di riferimento o un materiale di riferimento attualmente riconosciuto a livello internazionale per la standardizzazione. La riferibilità metrologica dei materiali di controllo si avvale degli standard interni di R-Biopharm AG sulla base di specifici ampliconi di DNA.

Per ulteriori informazioni sulla riferibilità metrologica contattare R-Biopharm AG.

Per conoscere i valori specificati, gli intervalli e ulteriori dettagli consultare il certificato di analisi (Certificate of Analysis, CoA).

Tabella 11: Interpretazione del risultato *

Rivelazione di				
<i>stx1/stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	IC	Risultato
+	-	-	+/-	STEC (EHEC) rivelabile
-	+	-	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelabile
-	-	+	+/-	EPEC rivelabile
+	+	-	+/-	STEC (EHEC) ed EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelabili
+	-	+	+/-	EHEC rivelabile
-	+	+	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. ed EPEC rivelabili
+	+	+	+/-	EHEC ed EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelabili
-	-	-	+	Geni target non rivelabili
-	-	-	-	Non valido

* + = positivo

- = negativo

La legge sulla protezione dalle infezioni (IfSG) descrive gli EHEC come gli *E. coli* produttori di tossina Shiga (STEC) che sono patogeni per l'uomo. Poiché al momento non è possibile stabilire una definizione esatta di STEC patogeni per l'uomo, **ogni** STEC è considerato un potenziale EHEC ⁽⁵⁾.

Un campione è positivo se il DNA del campione e l'Internal Control mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione è positivo anche se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma non è presente nessun segnale di amplificazione per l'**Internal Control** nel sistema di rivelazione. In questo caso non è necessario rivelare l'**Internal Control** perché elevate concentrazioni dell'amplicone possono rendere debole o assente il segnale dell'**Internal Control**.

Un campione è negativo se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale di amplificazione per l'**Internal Control** nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'**Internal Control** esclude l'inibizione della reazione PCR e una precedente estrazione.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'**Internal Control** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene inibitori o si è verificato un errore durante il processo di estrazione.

12. Limiti del metodo

1. Il test RIDA®UNITY EHEC/EPEC rivela il DNA dei fattori di virulenza di EHEC, STEC, EPEC ed EIEC/*Shigella* spp. in campioni fecali umani non trattati e di coltura. Pertanto, non è possibile dedurre una correlazione tra il livello di un determinato valore Ct e la presenza di sintomi clinici gravi. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
2. La diagnosi non dovrebbe basarsi solo sul risultato del test biologico molecolare, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
3. Questo test è approvato solo per la processazione automatizzata con il sistema RIDA®UNITY.
4. Questo test è verificato solo per campioni fecali e di coltura.
5. Quando si utilizza la matrice di coltura, non trasferire il terreno di coltura di agar nella reazione PCR perché questo può causare potenziali interferenze.
6. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento o un carico di patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
7. La presenza di inibitori della PCR può portare a risultati falsi negativi o non validi.
8. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, concentrazioni delle sequenze target sotto il limite di rivelabilità (LoD 95%) possono comunque essere rivelate, ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
9. Eventuali mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono produrre risultati falsi negativi utilizzando RIDA®UNITY EHEC/EPEC.
10. Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza dei geni target (EHEC, *stx1/2*, *eae*; STEC, *stx1/2*; EPEC, *eae*; ed EIEC/*Shigella* spp., *ipaH*).
11. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulle buone pratiche di laboratorio (BPL). Durante l'esecuzione del test, gli operatori devono seguire esattamente le istruzioni del fabbricante.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Prestazioni e caratteristiche cliniche

Il test di RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR è stato confrontato in un laboratorio esterno con un test di riferimento con marchio CE basato su 276 campioni di feci di pazienti con sintomi di infezione gastrointestinale.

I risultati mostrano una sensibilità e una specificità molto elevate nella rivelazione dei fattori di virulenza di EHEC, STEC, EPEC ed EIEC/*Shigella* spp. con l'uso del kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC.

Tabella 12: Rivelazione di *stx1/2* - campioni di feci

		PCR di riferimento		Totale
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>stx1/2</i>	Positivo	122	0	122
	Negativo	5	149	154
	Totale	127	149	276

Sensibilità relativa (IC 95%)	96,1% (91,1%–98,7%)
Specificità relativa (IC 95%)	100% (97,6%–100%)

Tabella 13: Rivelazione di *ipaH* - campioni di feci

		PCR di riferimento		Totale
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>ipaH</i>	Positivo	65	0	65
	Negativo	0	211	211
	Totale	65	211	276

Sensibilità relativa (IC 95%)	100% (94,5%–100%)
Specificità relativa (IC 95%)	100% (98,3%–100%)

Tabella 14: Rivelazione di *eae* - campioni di feci

		PCR di riferimento		Totale
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>eae</i>	Positivo	179	0	179
	Negativo	4	93	97
	Totale	183	93	276

Sensibilità relativa (IC 95%)	97,8% (94,5%–100%)
Specificità relativa (IC 95%)	100% (96,1%–100%)

13.2 Prestazioni e caratteristiche analitiche

13.2.1 Limite di rivelazione (LoD 95%)

Un campione di controllo positivo (campioni di feci negativi addizionati o con un campione di coltura) è stato misurato in cinque fasi di diluizione (in fasi di 0,25-log) per ogni target con 20 replicati per fase in un lotto per determinare il LoD. Ha fatto seguito un'analisi probit. Successivamente, il LoD calcolato è stato confermato con 20 replicati per target per la fase/concentrazione di diluizione calcolata.

Per i test sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

- *stx1/stx2*: *Escherichia coli* D3509 (il LoD per *stx2* è stato determinato perché *stx2* è associato alla sindrome emolitico-uremica).
- *ipaH*: *Escherichia coli* Fr1368
- *eae*: *Escherichia coli* DSM8695

Per la rivelazione del DNA di EHEC, STEC, EPEC ed EIEC/*Shigella* spp. utilizzando il test RIDA®UNITY EHEC/EPEC sul sistema UNITY, sono stati determinati i seguenti limiti di rivelazione (LoD).

I risultati di queste misurazioni sono mostrati nella Tabella 15.

Tabella 15: Risultati del limite di rivelazione del test RIDA®UNITY EHEC/EPEC per i target *stx1/2*, *ipaH* ed *eae*

	Matrice	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Feci	476.000 CFU/mL	5.300 CFU/mL	125.000 CFU/mL
	Coltura	2.130 CFU/mL	798 CFU/mL	2.890 CFU/mL

* CFU: Colony Forming Units

Il LoD per *stx1/2* nei campioni di feci è stato determinato a 476.000 CFU/mL.

Il LoD per *ipaH* nei campioni di feci è stato determinato a 5.300 CFU/mL.

Il LoD per *eae* nei campioni di feci è stato determinato a 125.000 CFU/mL.

Il LoD per *stx1/2* nei campioni di coltura è stato determinato a 2.130 CFU/mL.

Il LoD per *ipaH* nei campioni di coltura è stato determinato a 798 CFU/mL.

Il LoD per *eae* nei campioni di coltura è stato determinato a 2.890 CFU/mL.

Per il flusso di lavoro migliorato con CFX96™ Dx, questi valori di LoD sono stati confermati nell'ipotesi di rimanere in un intervallo di LoD di 2-3 volte.

13.2.2 Specificità analitica

Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della PCR e di sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Quindi, sono stati studiati gli effetti di diverse sostanze che potrebbero essere presenti perché ampiamente utilizzate nelle infezioni gastrointestinali o a causa della loro presenza diffusa nei campioni corrispondenti. Le sostanze che potrebbero influenzare in modo significativo i risultati del test sono state esaminate inizialmente ad alte concentrazioni (il triplo della dose giornaliera o la simulazione del caso peggiore) in un'analisi di interferenza.

Non sono state individuate interferenze per le sostanze elencate nella Tabella 16.

Tabella 16: Sostanze potenzialmente interferenti

Sostanza potenzialmente interferente	Concentrazione
Azithromycin-ratiopharm® compresse rivestite con film da 500 mg (azitromicina)	0,75% [p/v]
Solfato di bario	18,5% [v/v]
Cologran® dolcificante liquido (saccarina + ciclamato)	1,3% [p/v]
Sangue umano	5% [v/v]
Compresse di carbone 250 mg (carbone)	6% [p/v]
Loperamid-ratiopharm® akut (loperamide)	0,02% [v/v]
Mucine	5% [p/v]
Stearina/acido palmitico	40% [p/v]

Reazioni crociate

Sono stati studiati vari organismi (batteri, parassiti, funghi e virus) che si possono trovare comunemente nella matrice fecale. I microrganismi da studiare per questo test sono stati scelti perché si trovano naturalmente nei campioni di feci o causano sintomi corrispondenti ai patogeni gastrointestinali. Per le analisi sono stati utilizzati colture di batteri (tra 10⁶ e 10⁹ CFU/mL), colture di funghi o virus, surnatanti di colture virali, isolati e standard LGC dei rispettivi organismi.

Il test di RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR è specifico per EHEC, STEC, EPEC ed EIEC/*Shigella* spp. Non sono state rivelate reazioni crociate con le seguenti specie (vedere Tabella 17):

Tabella 17: Organismi potenzialmente cross-reattivi

Organismo	Risultato del test *		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adenovirus 40	-	-	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
Astrovirus 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <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> (sierotipo Enteritidis)	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (sierotipo Typhimurium)	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-

* - = negativo

** *Giardia intestinalis* e *Giardia lamblia* sono lo stesso organismo.

13.2.3 Precisione

La precisione del test di RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR è stata determinata per i seguenti livelli di valutazione.

Precisione *intra*-test: determinazione di 5 campioni di controllo con 20 replicati ciascuno su RIDA®UNITY in condizioni identiche.

Precisione *inter*-test: determinazione di 5 campioni di controllo in 20 esecuzioni in duplicato in 10 giorni (2 esecuzioni al giorno) eseguite da tecnici diversi in condizioni riproducibili.

I test di precisione *intra*-test e *inter*-test sono stati condotti utilizzando tre diversi lotti.

I coefficienti di variazione ottenuti per ogni misurazione con il test di RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR su RIDA®UNITY e su CFX96™ Dx sono stati del 4,29%.

Tabella 18: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY EHEC/EPEC per *stx1/2* da campioni di feci (sistema RIDA®UNITY)

Ct	Valore medio / CV	<i>Intra</i> -test			<i>Inter</i> -test			<i>Inter</i> -lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 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 (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	2,15%	2,23%	2,26%	2,28%
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	CV (%)	2,34%	2,05%	2,13	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno

Tabella 19: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY EHEC/EPEC per *stx1/2* da campioni di feci (CFX96™ Dx)

Ct	Valore medio / CV	Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 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 (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	2,96%	2,90%	2,76%	3,04%
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	CV (%)	1,52%	1,59%	3,43%	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno

Tabella 20: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY EHEC/EPEC per *ipaH* da campioni di feci (sistema RIDA®UNITY)

Ct	Valore medio / CV	Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 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 (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	1,44%	1,34%	1,45%	1,42%
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	CV (%)	0,88%	0,77%	0,69%	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno

Tabella 21: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY EHEC/EPEC per *ipaH* da campioni di feci (CFX96™ Dx)

Ct	Valore medio / CV	Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 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 (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	1,27%	1,45%	1,36%	1,36%
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	CV (%)	0,89%	0,53%	0,70%	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno

Tabella 22: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY EHEC/EPEC per eae da campioni di feci (sistema RIDA®UNITY)

Ct	Valore medio / CV	Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 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 (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	1,81%	1,78%	1,81%	1,80%
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	CV (%)	1,24%	0,78%	1,18%	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno

Tabella 23: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY EHEC/EPEC per eae da campioni di feci (CFX96™ Dx)

Ct	Valore medio / CV	Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 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 (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	1,32%	1,58%	1,48%	1,47%
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	CV (%)	0,73%	0,55%	0,68%	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno

13.2.4 Reattività analitica

La reattività del test di RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR è stata testata su un gruppo definito di ceppi di *E. coli* e *Shigella* (vedere Tabella 24).

Tabella 24: Test di reattività analitica

Ceppo	Risultato*		
	<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 alfa</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>	-	+	-

* + = positivo (almeno 2 dei 3 replicati positivi)

- = negativo

14. Cronologia delle versioni

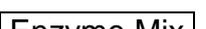
Numero della versione	Sezione e denominazione
2022-06-14	Versione di rilascio

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Fabbricante

Simboli specifici del test

	Miscela di reazione
	Miscela enzimatica
	Controllo negativo
	Controllo positivo

16. Bibliografia

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).