

## RIDA® UNITY EHEC/EPEC

**REF** UN2205



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

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



## 1. Tiltent bruk

Til bruk ved *in vitro*-diagnostikk. RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen, utført på RIDA®UNITY-plattformen, er en multiplex sanntids-PCR for direkte kvalitativ påvisning av DNA for virulensfaktorer av EHEC, STEC, EPEC, og EIEC/*Shigella* spp. i ubehandlede humane avføringsprøver og kulturprøver fra personer med tegn og symptomer på gastrointestinal infeksjon.

RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen er ment å støtte differensialdiagnosen av *E. coli*-infeksjoner (EHEC, EPEC, STEC og EIEC/*Shigella* spp.) hos pasienter med symptomer på gastroenteritt i forbindelse med andre kliniske funn og laboratoriefunn. Negative resultater utelukker ikke infeksjon med *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC, or EIEC/*Shigella* spp.) og bør ikke brukes som eneste grunnlag for diagnose.

Produktet er tiltent for profesjonell bruk.

## 2. Sammendrag og forklaring av testen

Diaré sykdommer er et betydelig helseproblem med ca. 1,7 milliarder tilfeller per år hos barn over hele verden.<sup>(1)</sup> Ifølge Verdens helseorganisasjon (WHO) er disse sykdommene den nest største dødsårsaken hos barn under 5 år, særlig i utviklingsland, med ca. 525 000 dødsfall per år.<sup>(1)</sup> En av de vanligste bakteriepatogenene ved diaré sykdom er *Escherichia coli*.<sup>(2)</sup>

*E. coli* er en gramnegativ, laktosegjærende, motil bakterie og tilhører familien *Enterobacteriaceae*. Den er en normal innbygger i mage-tarmkanalen, men kan også forårsake diaré sykdommer med høy sykkelighet og dødelighet hos barn, spesielt i utviklingsland. Følgende klasser av diaréfremkallende *E. coli* ble identifisert basert på bakteriens virulenskarakteristika, epidemiologi og kliniske manifestasjoner:

enteropatogen *E. coli* (EPEC), enterotoksigen *E. coli* (ETEC), enterohemoragisk *E. coli* (EHEC), enteroinvasiv *E. coli* (EIEC) og enteroaggregativ *E. coli* (EAEC). Alle disse diaréfremkallende patotypene av *E. coli* kan overføres via avføringsorganene.<sup>(3)</sup>

Blant de patogene *E. coli* i tarmen, har den enterohemoragiske *E. coli* (EHEC) fått særlig betydning. De er en undergruppe av shigatoksin- eller

verotoksinproduserende *E. coli* (STEC og VTEC, henholdsvis). Patogenisiteten til STEC kan spores til dens evne til å kolonisere tarmen ved å klebe seg til

tarmepitelcellene. Etter kolonisering kan bakteriene produsere to cytotoksiner,

verotoksin 1 og 2. På grunn av likheten mellom verotoksiner og shigatoksiner fra

*Shigella dysenteriae*, kalles VTEC også STEC. Andre viktige diagnostiske

EHEC-patogenisitetsfaktorer er ikke bare *stx1/stx2* (Shiga-toksingener), men også *eae*-genet (*E. coli*-bindende og -utslettende gen), som koder for intimin,

membranproteinet. Dette membranproteinet er ansvarlig for at patogenet fester seg til tarmepitelcellene.<sup>(4)</sup> Kliniske symptomer som kan forårsakes av EHEC/STEC hos

mennesker varierer fra blodig diaré til hemolytisk uremisk syndrom (HUS).<sup>(2, 5)</sup>

Smittekilder er hovedsakelig forurenset mat, mens færre enn 1000 bakterier er nok til å forårsake en EHEC/STEC-infeksjon. Det verste matrelaterte utbruddet forårsaket

av STEC i Tyskland så langt var i 2011. Dette utbruddet resulterte i 3816 identifiserte STEC-infeksjoner og 54 dødsfall, hvorav 32 var forbundet med HUS.<sup>(5)</sup>

Enteropatogen *E. coli* (EPEC) er kjent som en årsak til pediatrike diaré sykdommer, spesielt i utviklingsland.<sup>(3)</sup> EPEC kan skilles fra EHEC ved fravær av shigatoksiner.<sup>(3)</sup> De vanligste symptomene forbundet med en EPEC-infeksjon er vannholdig diaré, magesmerter, kvalme, oppkast og feber, mens infeksjonsdosen hos friske voksne er ca. 10<sup>8</sup> organismer.<sup>(5)</sup>

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) og *Shigella* spp. forårsaker også diaré sykdommer over hele verden, særlig i utviklingsland. De er begge gramnegative bakterier som er biokjemisk og genetisk nært beslektet med hverandre.<sup>(6)</sup> Patogenisiteten til EIEC og *Shigella* spp. er basert på plasmid-mediert invasjon av tarmepitelceller og deres ødeleggelse. Produktene til invasjonsplasmidantigenet H-gen (*ipaH*) er ansvarlige for denne prosessen. Dette genet er relevant for påvisning av EIEC/*Shigella* spp., noe som gjør det mulig å skille denne patotypen fra EHEC. Utbrudd av EIEC/*Shigella* spp.-infeksjoner anses hovedsakelig å være forårsaket av mat og manifesteres med diaré, magesmerter, kvalme og feber.<sup>(6)</sup>

### 3. Testprinsipp

RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC er en multiplex sanntids PCR for direkte kvalitativ påvisning og differensiering av gener for virulensfaktorene EHEC, STEC, EPEC og EIEC/*Shigella* spp. i humane avførings- eller kulturprøver.

Behandlingen er fullstendig automatisert med RIDA<sup>®</sup>UNITY-systemet. Først ekstraheres nukleinsyrene ved hjelp av RIDA<sup>®</sup>UNITY Universal Extraction Kit og Internal Control Kit.

Målesekvensen detekteres alltid i et ett-trinns sanntids RT-PCR-format (selv med DNA-analyser), det vil si at revers transkripsjon (RT) og påfølgende PCR utføres i ett reaksjonshetteglass. I prosessen transkriberes det isolerte RNA-et (hvis tilstede) til cDNA ved hjelp av revers transkriptase. De spesifikke genfragmentene av virulensfaktorene *stx1/stx2*, *eae* og *ipaH* forsterkes deretter ved hjelp av sanntids PCR.

De amplifiserte målesekvensene detekteres ved hjelp av hydrolyseprober som er merket med en slukker i den ene enden og et fluorescerende rapporterende fargestoff (fluorofor) i den andre. Sondene hybridiserer til ampliconet i nærvær av en målesekvens. I løpet av forlengelsestrinnet separerer Taq Polymerase det rapporterende stoffet fra slukkeren. Det rapporterende stoffet sender ut et fluorescerende signal som detekteres av den optiske enheten på et sanntids-PCR-instrument. Det fluorescerende signalet øker med mengden av dannede amplicon. RIDA<sup>®</sup>UNITY Internal Control Kit må brukes samtidig for å kunne kontrollere prøveklargjøring og/eller potensiell PCR-hemning.

#### 4. Medfølgende reagenser

Reagensene i settet er tilstrekkelige for 96 påvisninger\*.

**Tab. 1:** Medfølgende reagenser

REF	Reagens	Mengde		Lokkfarge
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 x	1935 µL	gul, klar til bruk
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 x	350 µL	rød, klar til bruk
UNZ2205PC	Positive Control	1 x	200 µL	blå, klar til bruk
UNZ2205NC	Negative Control	1 x	450 µL	hvit, klar til bruk

\* Ved gjentatt bruk og i mindre serier kan antall reaksjoner reduseres.

#### 5. Oppbevaringsinstruksjoner

- Følg retningslinjene for håndtering i tabell 2, og plasser settet straks til oppbevaring etter bruk i henhold til angitt informasjon.
- Alle reagenser må oppbevares mørkt ved -16 °C til -28 °C og kan (hvis de er uåpnet) brukes frem til utløpsdatoen som er angitt på etiketten. Kvalitetsgarantien er ikke lenger gyldig etter utløpsdatoen.
- Alle reagenser bør tines forsiktig før bruk (f.eks. i kjøleskap ved 2 - 8 °C).
- Gjentatt frysing og tining opptil 8 ganger påvirker ikke testegenskapene.

**Tab. 2:** Oppbevaringsforhold og informasjon

	Oppbevaringstemperatur	Maksimal lagringstid
uåpnet	-16 °C til -28 °C	Kan brukes frem til den angitte utløpsdatoen
åpnet	-16 °C til -28 °C	8 fryse-tinesykluser

## 6. Nødvendige reagenser som ikke medfølger

RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR-test er utelukkende beregnet på bruk med RIDA®UNITY-systemet. Følgende produkter er absolutt nødvendige for riktig bruk:

### 6.1 Reagenser

Følgende reagenser er nødvendig for å utføre RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen:

Reagenser	Artikkelnummer
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

### 6.2 Laboratorieutstyr

Følgende utstyr er nødvendig for å utføre RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen:

Utstyr
RIDA®UNITY-system; artikkelnummer: ZUNITY (R-Biopharm AG)
RIDA®UNITY forbruksvarer (tips, plater, reaksjonsflasker, film). Se bruksanvisningen for RIDA®UNITY-systemet, og bestill informasjon om forbruksartikler.
Vortexer
Bordplatesentrifuge
Pulverfrie engangshansker

Ekstern cykler (mulig systemforbedring)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

RIDA®UNITY EHEC/EPEC-settet kan brukes sammen med andre kompatible cyclere. Alternative sanntids-PCR-instrumenter må verifiseres/valideres av brukeren. Ta kontakt med R-Biopharm AG på [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de) for å verifisere kompatibiliteten.

## 7. Advarsler og forsiktighetsregler for brukerne

Til bruk ved *in vitro*-diagnostikk.

Denne testen må kun utføres av kvalifisert laboratoriepersonell. Retningslinjene for arbeid i medisinske laboratorier må følges.

Brukerhåndboken må alltid følges nøye ved utførelse av denne testen.

Ikke pipettér prøver eller reagenser med munnen. Unngå kontakt med ødelagt hud og slimhinner.

Bruk personlig verneutstyr (passende hansker, labfrakk, vernebriller) når du håndterer reagenser og prøver, og vask hendene etter at testen er fullført.

Ikke røyk, spis eller drikk i områder der prøver behandles.

Unngå å forurense prøvene og komponentene i settet med mikrober og nukleaser (DNase/RNase).

Kliniske prøver må betraktes som potensielt smittsomme og må avhendes på en hensiktsmessig måte, i likhet med alle reagenser og materialer som kommer i kontakt med potensielt smittefarlige prøver.

Ikke bytt ut eller kombiner komponentene (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) fra ett settparti med komponenter fra et annet parti.

Testsettet kan brukes i 8 uker lenge etter første åpning (settet kan lastes på nytt opptil 6 ganger). Ikke bruk testsettet etter utløpsdatoen. Disse spesifikasjonene kontrolleres også av RIDA®UNITY-systemet.

Brukerne er ansvarlige for riktig avhending av alle reagenser og materialer etter bruk. Følg nasjonale forskrifter for avhending.

Ytterligere informasjon om sikkerhetsdatabladet (Safety Data Sheet, SDS) finner du under varenummeret på <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

For brukere i Den europeiske union: Rapportér alle alvorlige bivirkninger forbundet med produktet til R-Biopharm AG og de relevante nasjonale myndighetene.

Sammendraget av sikkerhet og ytelse (SSP) for dette produktet vil være tilgjengelig på <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> når den Europeiske databanken for medisinsk utstyr (EUDAMED) kommer i gang. I databasen søker du etter utstyret ved hjelp av UDI-DI på utstyrets ytre emballasje.

## 8. Innsamling og oppbevaring av prøver

Det anbefales å bruke ferskt prøvemateriale for å oppnå best mulig ytelse av RIDA®UNITY EHEC/EPEC-analysen.

Unngå gjentatt frysing og tining av prøven.

Ikke samle avføringsprøvene i transportbeholdere som inneholder transportmedier med konserveringsmidler, dyresera, metallioner, oksidasjonsagenter eller rengjøringsmidler, siden slike stoffer kan forstyrre RIDA®UNITY-testene.

Det anbefales å lage alikvoter av prøvene for å unngå gjentatt tining og frysing. Frosne prøver skal tines umiddelbart før ekstraksjon for å hindre nedbrytning av nukleinsyrene.

Følg instruksjonene for lagring av prøver i tabell 3 til 6.

**Tab. 3:** Prøvelagring - EHEC-påvisning

Opprinnelige prøver - avføring		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dager	≤ 7 dager	≤ 6 måneder

Opprinnelige prøver - kultur		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
< 1 dag	< 1 dag	-

I eluat (fra avføring eller kultur)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 timer	≤ 36 timer	≤ 7 dager

Ved en lagringstemperatur på -20 °C / -80 °C påvirkes ikke testegenskapene av gjentatt frysing/tining av avføringsprøven opptil 5 ganger.

Ved en lagringstemperatur på -20 °C påvirkes ikke testegenskapene av gjentatt frysing/tining av eluatet (fra avføring eller kultur) opptil 3 ganger.

Ikke dyrk kulturer fra tidligere frosne avføring fordi frysing i alvorlig grad påvirker vekstegenskapene til patogenene, og dette kan potensielt føre til falskt negative resultater.

**Tab. 4:** Prøvelagring - STEC-påvisning

Opprinnelige prøver - avføring		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dager	≤ 7 dager	≤ 6 måneder

Opprinnelige prøver - kultur		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
< 1 dag	< 1 dag	-

I eluat (fra avføring eller kultur)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 timer	≤ 36 timer	≤ 7 dager

Ved en lagringstemperatur på -20 °C / -80 °C påvirkes ikke testegenskapene av gjentatt frysing/tinging av avføringsprøven opptil 5 ganger.

Ved en lagringstemperatur på -20 °C påvirkes ikke testegenskapene av gjentatt frysing/tinging av eluatet (fra avføring eller kultur) opptil 3 ganger.

Ikke dyrk kulturer fra tidligere frossen avføring fordi frysing i alvorlig grad påvirker vekstegenskapene til patogenene, og dette kan potensielt føre til falskt negative resultater.

**Tab. 5:** Lagring av prøver - EPEC-påvisning

Opprinnelige prøver - avføring		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dager	≤ 7 dager	≤ 6 måneder

Opprinnelige prøver - kultur		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
< 1 dag	< 1 dag	-

I eluat (fra avføring eller kultur)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 timer	≤ 36 timer	≤ 7 dager

Ved en lagringstemperatur på -20 °C / -80 °C påvirkes ikke testegenskapene av gjentatt frysing/tinging av avføringsprøven opptil 5 ganger.

Ved en lagringstemperatur på -20 °C påvirkes ikke testegenskapene av gjentatt frysing/tinging av eluatet (fra avføring eller kultur) opptil 3 ganger.



Ikke dyrk kulturer fra tidligere frossen avføring fordi frysing i alvorlig grad påvirker vekstegenskapene til patogenene, og dette kan potensielt føre til falskt negative resultater.

**Tab. 6:** Lagring av prøver - påvisning av EIEC/*Shigella* spp.

Opprinnelige prøver - avføring		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
< 1 dag	≤ 7 dager	≤ 6 måneder

Opprinnelig prøve - kultur		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	< 1 dag	-

I eluat (fra avføring eller kultur)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 timer	≤ 36 timer	≤ 7 dager

Ved en lagringstemperatur på -20 °C / -80 °C påvirkes ikke testegenskapene av gjentatt frysing/tinging av avføringsprøven opptil 5 ganger.

Ved en lagringstemperatur på -20 °C påvirkes ikke testegenskapene av gjentatt frysing/tinging av eluatet (fra avføring eller kultur) opptil 3 ganger.

Ikke dyrk kulturer fra tidligere frossen avføring fordi frysing i alvorlig grad påvirker vekstegenskapene til patogenene, og dette kan potensielt føre til falskt negative resultater.

### 8.1 DNA-preparering fra avførings- og kulturprøver

For å isolere DNA fra avførings- og kulturprøver, bruk RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Følg de korrekte prosedyrene i bruksanvisningen for RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (seksjon: Nukleinsyrepreparering fra avføringsprøver; seksjon: Nukleinsyrepreparering fra kulturprøver).

## 9. Testprosedyre

Plasser både prøvene og reagensene i RIDA®UNITY EHEC/EPEC-settet på RIDA®UNITY-systemet i begynnelsen av bruken.

Bland tilstrekkelig **Reaction Mix**, **Negative Control** og **Positive Control** på forhånd ved hjelp av en vortekser. Ikke virvle opp **Enzyme Mix**. Etterpå sentrifugeres alle komponentene kort.

PCR-rørene for prøvene som skal undersøkes, skal på forhånd plasseres i den integrerte PCR-cycleren.

Bærere er tilgjengelige for riktig lasting av systemet med reagenser og forbruksartikler. For lasteprosessen, følg instruksjonene til RIDA®UNITY-systemet. Følg de relevante avsnittene i håndboken til RIDA®UNITY-systemet (seksjon: Utføre en kjøring).

RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen kan bare brukes i kombinasjon med RIDA®UNITY Internal Control Kit. Dette muliggjør tidlig gjenkjenning av potensiell PCR-hemning, verifisering av reagensintegritet og bekreftelse av vellykket nukleinsyreekstraksjon. Prosedyren er beskrevet i bruksanvisningen til RIDA®UNITY Internal Control Kit (seksjon: Testprosedyre).

Automatisert behandling er beskrevet i RIDA®UNITY-systemhåndboken (seksjon: Utføre en kjøring).

## 9.1 Enhetsinnstillinger

### 9.1.1 Universal sanntids PCR-profil

For å harmonisere RIDA®UNITY-analysene, ble RIDA®UNITY EHEC/EPEC-analysen verifisert i den universelle profilen. Dette gjør det mulig å kombinere DNA- og RNA-analyser med hverandre. Omvendt transkripsjon kommer derfor først i den universelle profilen.

**Tab. 7:** Universal sanntids-PCR-profil for RIDA®UNITY

<u>Omvendt transkripsjon</u>	10 min, 58 °C
Første denaturering	1 min, 95 °C
Sykluser	45 sykluser
<u>PCR</u> Denaturering	10 sek, 95 °C
Gløding/forlengelse	15 sek, 60 °C
Temperaturrendringshastighet/rampehastighet	Maksimal

**Merk:** Gløding og forlengelse skjer i samme trinn.

**Tab. 8:** Universell sanntids PCR-profil for CFX96™ Dx

<u>Omvendt transkripsjon</u>	10 min, 58 °C
Første denaturering	1 min, 95 °C
Sykluser	45 sykluser
<u>PCR</u> Denaturering	15 sek, 95 °C
Gløding/forlengelse	30 sek, 60 °C
Temperaturrendringshastighet/rampehastighet	Maksimal

**Merk:** Gløding og forlengelse skjer i samme trinn.

## 9.2 Innstilling av deteksjonskanal

**Tab. 9:** Valg av passende deteksjonskanaler

Sanntids-PCR-instrument	Deteksjon	Deteksjonskanal	Merk
<b>R-Biopharm RIDA®UNITY</b>	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK-kanal stx
	Internkontroll	HEX	SEEK-kanal ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK-kanal ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK-kanal eae
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK-kanal stx
	Internkontroll	VIC	SEEK-kanal ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK-kanal ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK-kanal eae

## 10. Kvalitetskontroll - Indikasjon på ustabilitet eller utløpte reagenser

Prøvene evalueres ved hjelp av RIDA®SEEK analytisk programvare fra RIDA®UNITY-systemet. **Negative Control** og **Positive Control** må vise de riktige resultatene (se tab. 9).

**Positive Control** er til stede i en konsentrasjon på  $10^3$  kopier/ $\mu$ L. Den brukes i en total mengde på  $5 \times 10^3$  kopier i hver PCR-kjøring.

**Negative Control** inneholder allerede RIDA®UNITY Internal Control. Siden kontrollene ikke inneholder en mal, kan det ikke forventes noen signaler i målkanalene. Positive signaler i IC-kanalen som den interne kontrollen detekteres med, er avgjørende (se tab. 10).

**Tab.10:** En gyldig PCR-kjøring må oppfylle følgende vilkår:

Prøve	Resultat	IC Ct	Målgen Ct
Positiv kontroll	+	N/A*	Se Certificate of Analysis
Negativ kontroll	-	Ct > 20	0

\*Under visse omstendigheter kan IC-kanalen ha et positivt signal i den positive kontrollen og bør derfor ikke evalueres.

Hvis den positive kontrollen ikke er i det angitte Ct-området, men den negative kontrollen er gyldig, må alle reaksjoner analyseres på nytt i PCR.

Hvis den negative kontrollen ikke er negativ, men den positive kontrollen er gyldig, må alle reaksjoner, inkludert kontrollene, analyseres på nytt i PCR.

Om de spesifiserte verdiene ikke oppnås, kontroller følgende elementer før du gjentar testen:

- Utløpsdatoen for de anvendte reagensene
- Funksjonaliteten til utstyret som brukes
- At testprosedyren ble gjennomført på riktig måte

Hvis betingelsene fortsatt ikke er oppfylt etter gjentatt test, må du kontakte produsenten eller din lokale R-Biopharm-forhandler.

## 11. Evaluering og tolkning

Prøveevaluering og tolkning gjøres ved hjelp av RIDA®UNITY-systemets analytiske programvare, RIDA®SEEK.

Det finnes ingen gjeldende internasjonalt anerkjent referansem metode eller referansemateriale for standardisering. Kontrollmaterialene kan spores metrologisk til interne R-Biopharm AG-standarder basert på spesifikke DNA-amplikon.

For ytterligere informasjon om metrologisk sporbarhet, kontakt R-Biopharm AG.

Spesifiserte verdier, måleområder og ytterligere detaljer finnes i vedlagte analysesertifikat (Certificate of Analysis, CoA).

**Tab.11:** Tolkning av resultater\*

Påvisning av				
<i>stx1/stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	IC	Resultat
+	-	-	+/-	STEC (EHEC) påviselig
-	+	-	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. påviselig
-	-	+	+/-	EPEC påviselig
+	+	-	+/-	STEC (EHEC) og EIEC/ <i>Shigella</i> spp. påviselig
+	-	+	+/-	EHEC påviselig
-	+	+	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. og EPEC påviselig
+	+	+	+/-	EHEC og EIEC/ <i>Shigella</i> spp. påviselig
-	-	-	+	Målgener ikke detekterbare
-	-	-	-	Ugyldig

\*+= positiv

- = negativ

Infeksjonsvernloven (IfSG) beskriver EHEC som de shigatoksin-produserende *E. coli* (STEC) som er humane patogener. Siden en nøyaktig definisjon av humant patogen STEC ikke kan fastsettes på dette tidspunktet, anses **hvert** STEC som et potensielt EHEC.<sup>(5)</sup>

En prøve er positiv hvis prøvens DNA og Internal Control viser et amplifikasjonssignal i deteksjonssystemet.

En prøve er også positiv hvis prøvens DNA viser et amplifikasjonssignal, men ingen amplifikasjonssignal for Internal Control vises i deteksjonssystemet. Deteksjon av Internal Control er ikke nødvendig i dette tilfellet, fordi høye

amplikonkonsentrasjoner kan forårsake et svakt eller fraværende signal av **Internal Control**.

En prøve er negativ hvis prøvens DNA ikke viser et amplifikasjonssignal, men et amplifikasjonssignal for **Internal Control** er synlig i deteksjonssystemet. Inhibering av PCR-reaksjonen og tidligere ekstraksjon kan utelukkes ved påvisning av **Internal Control**.

En prøve er ugyldig hvis prøvens DNA og **Internal Control** ikke viser amplifikasjonssignal i deteksjonssystemet. Det er inhibitorer i prøven, eller det har oppstått en feil under ekstraksjonsprosessen.

## 12. Metodens begrensninger

1. RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC-testen detekterer DNA for virulensfaktorene til EHEC, STEC, EPEC og EIEC/*Shigella* spp. i ubehandlede prøver av human avføring og kultur. En sammenheng mellom nivået av den målte Ct-verdien og forekomsten eller alvorlighetsgraden av kliniske symptomer kan ikke utledes fra dette. Resultatet må alltid tolkes i kombinasjon med alle foreliggende kliniske symptomer.
2. Diagnosen skal ikke baseres på resultatet av den molekylærbiologiske analysen alene, men det skal alltid tas hensyn til pasientens medisinske anamnese og symptomer.
3. Denne testen er kun godkjent for automatisk behandling ved hjelp av RIDA<sup>®</sup>UNITY-systemet.
4. Denne testen er kun verifisert for avførings- og kulturprøver.
5. Når du bruker dyrkingsmatrisen, må du ikke overføre agarmediet til PCR-reaksjonen fordi dette kan føre til potensiell interferens.
6. Feil prøvetaking, transport, lagring og håndtering, eller en patogenbelastning under testens analytiske sensitivitet, kan føre til falskt negative resultater.
7. Tilstedeværelsen av PCR-inhibitorer kan føre til falskt negative eller ugyldige resultater.
8. Som for alle PCR-baserte *in vitro*-diagnostiske tester, kan det påvises ekstremt lave konsentrasjoner av målsekvensene som er under påvisningsgrensen (LoD 95 %). Resultatene som oppnås er ikke alltid reproducerbare.
9. Mutasjoner eller polymorfismer i primer- eller sondebindingsstedene kan forstyrre påvisning av nye eller ukjente varianter og kan føre til falskt negative resultater ved bruk av RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC.
10. Et positivt testresultat indikerer ikke nødvendigvis forekomsten av levedyktige organismer. Et positivt resultat indikerer at målgener (EHEC, *stx1/2*, *eae*; STEC, *stx1/2*; EPEC, *eae*; og EIEC/*Shigella* spp., *ipaH*) er til stede.
11. Denne analysen bør utføres i samsvar med forskriften om god laboratoriepraksis (GLP). Brukere må følge produsentens instruksjoner nøyaktig når de utfører testen.

## 13. Ytelsesegenskaper

### 13.1 Kliniske ytelsesegenskaper

RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR ble sammenlignet i et eksternt laboratorium med en CE-merket referansetest basert på 276 avføringsprøver fra pasienter med symptomer på gastrointestinal infeksjon.

Resultatene viser svært høy følsomhet og spesifisitet ved påvisning av virulensfaktorer for EHEC, STEC, EPEC og EIEC/*Shigella* spp. ved bruk av RIDA®UNITY EHEC/EPEC-settet.

**Tab. 12:** Påvisning av *stx1/2* - avføringsprøver

		Referanse-PCR		Totalt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>stx1/2</i>	Positiv	122	0	122
	Negativ	5	149	154
	Totalt	127	149	276

Relativ følsomhet (95 % CI)	96,1 % (91,1 % - 98,7 %)
Relativ spesifisitet (95 % CI)	100 % (97,6 % - 100 %)

**Tab. 13:** Påvisning av *ipaH* - avføringsprøver

		Referanse-PCR		Totalt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>ipaH</i>	Positiv	65	0	65
	Negativ	0	211	211
	Totalt	65	211	276

Relativ følsomhet (95 % CI)	100 % (94,5 % - 100 %)
Relativ spesifisitet (95 % CI)	100 % (98,3 - 100 %)



**Tab. 14:** Påvisning av *eae* - avføringsprøver

		Referanse-PCR		Totalt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>eae</i>	Positiv	179	0	179
	Negativ	4	93	97
	Totalt	183	93	276

Relativ følsomhet (95 % CI)	97,8 % (94,5 % - 100 %)
Relativ spesifisitet (95 % CI)	100 % (96,1 % - 100 %)

## 13.2 Analytiske ytelsesegenskaper

### 13.2.1 Påvisningsgrense (LoD 95 %)

En positiv kontrollprøve (negative avføringsprøver tilsatt analytt, eller med bruk av en kulturprøve) ble målt i fem fortykningstrinn (i 0,25-loggtrinn) for hvert målgjen med 20 replikater per trinn i én lot for å bestemme LoD. Dette ble etterfulgt av en probitanalyse. Deretter ble den beregnede LoD bekreftet med 20 replikater per målgjen for det beregnede fortykningstrinnet/konsentrasjonen.

Følgende stammer ble brukt til testing:

- *stx1/stx2*: *Escherichia coli* D3509 (LoD for *stx2* ble bestemt fordi *stx2* er forbundet med hemolytisk uremisk syndrom.)
- *ipaH*: *Escherichia coli* Fr1368
- *eae*: *Escherichia coli* DSM8695

For påvisning av EHEC, STEC, EPEC og EIEC/*Shigella* spp.DNA ved bruk av RIDA®UNITY EHEC/EPEC-analysen på UNITY-systemet, ble følgende påvisningsgrenser (LoD) fastsatt.

Resultatene av disse målingene er vist i tabell 15.

**Tab. 15:** Resultater av påvisningsgrensen for RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen for mål *stx1/2*, *ipaH* og *eae*.

	Matrise	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Avføring	476 000 CFU/mL	5300 CFU/mL	125 000 CFU/mL
	Kultur	2130 CFU/mL	798 CFU/mL	2890 CFU/mL

\*CFU: Colony Forming Units

LoD for *stx1/2* i avføringsprøver ble bestemt til 476 000 CFU/mL.

LoD for *ipaH* i avføringsprøver ble bestemt til 5300 CFU/mL.

LoD for *eae* i avføringsprøver ble bestemt til 125 000 CFU/mL.

LoD for *stx1/2* i kulturprøver ble bestemt til 2130 CFU/mL.

LoD for *ipaH* i kulturprøver ble bestemt til 798 CFU/mL.

LoD for *eae* i kulturprøver ble bestemt til 2890 CFU/mL.

For den forbedrede arbeidsflyten ved hjelp av CFX96™ Dx, ble disse LoD-verdiene bekreftet under forutsetning av at vi holder oss i et 2-3 ganger LoD-område.

### 13.2.2 Analytisk spesifisitet

#### Forstyrrende stoffer

Tilstedeværelsen av PCR-inhibitorer og interfererende stoffer kan føre til falskt negative eller ugyldige resultater. Derfor ble effekten av ulike stoffer som kan forekomme på grunn av utbredt bruk for gastrointestinale infeksjoner eller utbredt forekomst i de tilsvarende prøvene undersøkt.

Stoffer som potensielt kan påvirke prøvingsresultatene i betydelig grad, ble først undersøkt ved høye konsentrasjoner (tredoblet daglig dose eller simulering av det verste tilfellet) i en interferensskjerm.

Det ble ikke funnet interferens for stoffene oppført i tabell 16.

**Tab. 16:** Potensielt forstyrrende stoffer

Potensielt forstyrrende stoff	Konsentrasjon
Azitromycin-ratiopharm® 500 mg filmdrasjerte tabletter (azitromycin)	0,75 % [w/v]
Bariumsulfat	18,5 % [v/v]
Cologran® flytende søtningsmiddel (sakkarin + syklat)	1,3 % [w/v]
Humant blod	5 % [v/v]
Kulltabletter 250 mg (kull)	6 % [w/v]
Loperamid-ratiopharm® akut (loperamid)	0,02 % [v/v]
Muciner	5 % [w/v]
Stearin-/palmitinsyre	40 % [w/v]

## Kryssreaksjoner

Forskjellige organismer (bakterier, parasitter, sopp og virus) som er vanlig å finne i avføringsmatrisen ble undersøkt. Mikroorganismene som ble undersøkt for denne analysen ble valgt fordi de enten forekommer naturlig i avføringsprøver, eller de forårsaker tilsvarende symptomer som gastrointestinale patogener. Til analysene ble det brukt bakteriekulturer (mellom 10<sup>6</sup> og 10<sup>9</sup> CFU/mL), sopp- eller viruskulturer, supernatanter av viruskulturer, isolater, og LGC-standarder for den respektive organismen.

RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC /EPEC multiplex real-time PCR er spesifikk for EHEC, STEC, EPEC og EIEC/*Shigella* spp. Ingen kryssreaksjoner med følgende arter ble påvist se tab. 17:

**Tab. 17:** Potensielt kryssreaktive organismer.

Organisme	Testresultat*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adenovirus 40	-	-	-
Adenovirus 41, humant, Tak-stamme	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
Astrovirus 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> underart <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> underart <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-klone 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>	-	-	-

\* - = negativ

\*\* *Giardia intestinalis* og *Giardia lamblia* er samme organisme.

### 13.2.3 Presisjon

Presisjonen til RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR-testen ble bestemt for følgende vurderingsnivåer.

*Intra-assay*-presisjon: Bestemmelse av 5 kontrollprøver ved bruk av 20 replikater hver på RIDA®UNITY under identiske forhold.

*Inter-assay*-presisjon: Bestemmelse av 5 kontrollprøver i 20 kjøringene i to eksemplarer over 10 arbeidsdager (2 kjøringene per dag) utført av forskjellige teknikere under reproduerbare forhold.

Testing for *intra*-og *inter-assay* presisjon ble utført ved hjelp av tre forskjellige partier.

Variasjonskoeffisientene som ble oppnådd for hver måling ved bruk av RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR-testen på RIDA®UNITY og CFX96™ Dx var 4,29 %.

**Tab. 18:** Resultater av presisjonen til RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen for *stx1/2* fra avføringsprøver (RIDA®UNITY-systemet).

Ct	Gjennomsnittsverdi / CV	<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>
		Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 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 (%)	N/A	N/A	N/A	2,15 %	2,23 %	2,26 %	2,28 %
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	CV (%)	2,34 %	2,05 %	2,13	N/A	N/A	N/A	N/A

**Tab. 19:** Resultater av presisjonen til RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen for stx1/2 fra avføringsprøver (CFX96™ Dx).

Ct	Gjennomsnittsverdi / CV	Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 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 (%)	N/A	N/A	N/A	2,96 %	2,90 %	2,76 %	3,04 %
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	CV (%)	1,52 %	1,59 %	3,43 %	N/A	N/A	N/A	N/A

**Tab. 20:** Resultater av presisjonen til RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen for *ipaH* fra avføringsprøver (RIDA®UNITY-systemet).

Ct	Gjennomsnittsverdi / CV	Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 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 (%)	N/A	N/A	N/A	1,44 %	1,34 %	1,45 %	1,42 %
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	CV (%)	0,88 %	0,77 %	0,69 %	N/A	N/A	N/A	N/A

**Tab. 21:** Resultater av presisjonen til RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen for *ipaH* fra avføringsprøver (CFX96™ Dx).

Ct	Gjennomsnittsverdi / CV	Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 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 (%)	N/A	N/A	N/A	1,27 %	1,45 %	1,36 %	1,36 %
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	CV (%)	0,89 %	0,53 %	0,70 %	N/A	N/A	N/A	N/A



**Tab. 22:** Resultater av presisjonen til RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen for eae fra avføringsprøver (RIDA®UNITY-systemet).

Ct	Gjennomsnittsverdi / CV	Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 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 (%)	N/A	N/A	N/A	1,81 %	1,78 %	1,81 %	1,80 %
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	CV (%)	1,24 %	0,78 %	1,18 %	N/A	N/A	N/A	N/A

**Tab. 23:** Resultater av presisjonen til RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testen for eae fra avføringsprøver (CFX96™ Dx).

Ct	Gjennomsnittsverdi / CV	Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 1	Settparti 2	Settparti 3	Settparti 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 (%)	N/A	N/A	N/A	1,32 %	1,58 %	1,48 %	1,47 %
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	CV (%)	0,73 %	0,55 %	0,68 %	N/A	N/A	N/A	N/A

### 13.2.4 Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten til RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR-testen ble undersøkt på et definert panel av *E. coli*- and *Shigella*-stammer (se tab. 24).

**Tab. 24:** Analytisk reaktivitetstesting

Stamme	Resultat*		
	<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>	-	+	-

\*+ = positiv (minst 2 av 3 positive replikater)

- = negativt

## 14. Versjonshistorikk





Versjonsnummer	Avsnitt og betegning
2022-06-14	Utgivelsesversjon

## 15. Symbolforklaring

### Generelle symboler

	For <i>in vitro</i> -diagnostisk bruk
	Følg bruksanvisningen
	Batchnummer
	Brukes innen
	Oppbevaringstemperatur
	Artikkelnummer
	Antall tester
	Produksjonsdato
	Produsent

### Testspesifikke symboler

	reaksjonsmiks
	Enzymblanding
	Negativ kontroll
	Positiv kontroll

## 16. Referanser

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).