

## RIDA® UNITY EHEC/EPEC

**REF** UN2205



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

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



## 1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC, realizado na plataforma RIDA®UNITY, é um multiplex real-time PCR para a detecção qualitativa direta do DNA para fatores de virulência de EHEC, STEC, EPEC e EIEC/*Shigella* spp. em amostras de fezes humanas não tratadas e amostras de cultura de pessoas com sinais e sintomas de gastroenterite aguda.

O teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC destina-se a apoiar o diagnóstico diferencial de infecções por *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC e EIEC/*Shigella* spp.) em pacientes com sintomas de gastroenterite em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais. Resultados negativos não excluem a infecção por *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC ou EIEC/*Shigella* spp.) e não devem ser usados como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado ao uso profissional.

## 2. Sumário e explicação do teste

As doenças diarreicas são um problema de saúde significativo e causam aproximadamente 1,7 bilhões de casos por ano em crianças em todo o mundo.<sup>(1)</sup> Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), com aproximadamente 525.000 mortes por ano, estas doenças são a segunda principal causa de morte em crianças menores de 5 anos, especialmente em países em desenvolvimento.<sup>(1)</sup> Um dos patógenos bacterianos mais comuns da doença diarreica é a *Escherichia coli*.<sup>(2)</sup> A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, fermentadoras de lactose, móvel e pertence à família *Enterobacteriaceae*. É uma habitante normal do trato gastrointestinal, mas também pode causar doenças diarreicas com alta morbidade e mortalidade em crianças, especialmente em países em desenvolvimento. As seguintes classes de *E. coli* diarreica foram identificadas com base nas características de virulência, epidemiologia e manifestações clínicas da bactéria: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Todos esses patógenos diarreicos da *E. coli* podem ser transmitidos através da via fecal-oral.<sup>(3)</sup> Entre as *E. coli* patogênicas intestinais, as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) ganharam especial importância. Elas são um subgrupo da toxina Shiga e da *E. coli* produtora de verotoxina (STEC ou VTEC). A patogenicidade da STEC pode ser rastreada à sua capacidade de colonizar o intestino através da adesão às células epiteliais intestinais. Após a colonização, as bactérias são capazes de produzir duas citotoxinas: a verotoxina 1 e 2. Devido à similaridade das verotoxinas com a toxina Shiga da *Shigella dysenteriae*, as VTECs também são chamadas de STECs. Outros importantes fatores patogênicos diagnósticos do EHEC não são apenas os genes da toxina Shiga *stx1/stx2*, mas também o gene *eae* (*E. coli* attaching and effacing gene), que codifica intimina, a proteína da membrana. Esta proteína de membrana é responsável pela adesão do patógeno às células epiteliais intestinais.<sup>(4)</sup> Os sintomas clínicos que podem ser causados pela EHEC/STEC em humanos variam de diarreia sanguinolenta a síndrome hemolítica urêmica (SHU).<sup>(2, 5)</sup> As fontes de infecção são

principalmente alimentos contaminados, enquanto menos de 1000 bactérias são suficientes para causar uma infecção pela EHEC/STEC. O pior surto relacionado a alimentos causado pela STEC na Alemanha até agora foi em 2011. Este surto resultou em 3816 infecções pela STEC identificadas e 54 mortes, das quais 32 foram associadas a SHU.<sup>(5)</sup>

A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) é conhecida como causa de doenças diarreicas pediátricas, especialmente em países em desenvolvimento.<sup>(3)</sup> A EPEC pode ser distinguida da EHEC pela ausência de toxinas Shiga.<sup>(3)</sup> Os sintomas mais comuns associados a uma infecção pela EPEC são diarreia aquosa, dor abdominal, náuseas, vômitos e febre, enquanto a dose infecciosa em adultos saudáveis é de cerca de  $10^8$  organismos.<sup>(5)</sup>

A *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e a *Shigella* spp. também causam doenças diarreicas em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento. São ambas bactérias Gram-negativas que estão bioquímica e geneticamente relacionadas uma com a outra.<sup>(6)</sup> A patogenicidade de EIEC e *Shigella* spp. é baseada na invasão mediada por plasmídeos de células epiteliais intestinais e sua destruição. Os produtos do gene do antígeno plasmídeo de invasão H(*ipaH*) são responsáveis por este processo. Este gene é relevante para a detecção de EIEC/*Shigella* spp., tornando possível distinguir este patógeno da EHEC. Os surtos de infecções EIEC/*Shigella* spp. são considerados causados principalmente por alimentos e se manifestam com diarreia, dor abdominal, náusea e febre.<sup>(6)</sup>

### 3. Princípio do teste

O RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC é um multiplex real-time PCR para a detecção direta e qualitativa e a diferenciação de genes para fatores de virulência de EHEC, STEC, EPEC, EIEC/*Shigella* spp. em amostras e culturas de fezes humanas.

O processamento é totalmente automatizado com o sistema RIDA<sup>®</sup>UNITY. Primeiro, os ácidos nucleicos são extraídos usando o RIDA<sup>®</sup>UNITY Universal Extraction Kit e o Kit de Controle Interno.

A sequência-alvo é sempre detectada em um formato de RT-PCR em tempo real de uma etapa (mesmo em ensaios de DNA), ou seja, a transcrição reversa (RT) e a PCR subsequente são realizadas em um tubo de ensaio. No processo, o RNA isolado (se presente) é transcrito para o cDNA com ajuda de uma transcriptase reversa. Os fragmentos de genes específicos dos fatores de virulência *stx1/stx2*, *eae* e *ipaH* são então amplificados usando PCR em tempo real.

As sequências-alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência-alvo. Durante a extensão, a Taq polimerase separa o marcador do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O RIDA<sup>®</sup>UNITY Internal Control Kit deve ser usado ao

mesmo tempo para que seja possível verificar a preparação da amostra e/ou a potencial inibição da PCR.

#### 4. Reagentes fornecidos

Os reagentes do kit são suficientes para 96 determinações\*.

**Tab. 1:** Reagentes fornecidos

REF	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	amarelo, pronto para uso
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	vermelho, pronto para uso
UNZ2205PC	Positive Control	1 ×	200 µL	azul, pronto para uso
UNZ2205NC	Negative Control	1 ×	450 µL	branco, pronto para uso

\* Com o uso repetido e em séries menores, o número de reações pode ser reduzido.

#### 5. Instruções de armazenamento

- Siga as diretrizes de manuseamento da Tabela 2 e guarde o kit diretamente após a utilização, de acordo com as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz de -16 °C a -28 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. A garantia de qualidade já não é válida após a data de expiração.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 - 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetido até 8 vezes não afeta as propriedades do teste.

**Tab. 2:** Condições de armazenamento e informação

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
fechado	-16 °C a -28 °C	Pode ser usado até a data de validade impressa
aberto	-16 °C a -28 °C	8 ciclos de congelamento-descongelamento

## 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR é destinado exclusivamente para utilização com o sistema RIDA®UNITY. Os seguintes produtos são absolutamente necessários para utilização correta.

### 6.1 Reagentes

Os seguintes reagentes são necessários para realizar o teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC:

Reagentes	Número do item
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

### 6.2 Equipamentos de laboratório

O equipamento seguinte é necessário para realizar o teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC:

Equipamentos
Sistema RIDA®UNITY; número do item: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Consumíveis RIDA®UNITY (pontas, placas, frascos de reação, filmes). Consultar as instruções de utilização do sistema RIDA®UNITY, solicitando informações sobre consumíveis.
Vortexer
Centrífuga de bancada
Luvas descartáveis sem pó
Ciclador externo (possível aperfeiçoamento do sistema)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

O kit RIDA®UNITY EHEC/EPEC pode ser usado em conjunto com outros cicladores compatíveis. Os instrumentos alternativos de PCR em tempo real devem ser verificados/validados pelo usuário. Por favor contacte a R-Biopharm AG em [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de) para verificar a compatibilidade.

## 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Para diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. Devem ser observadas as diretrizes para trabalho em laboratórios médicos.

Ao realizar este teste, sempre siga estritamente o manual de operação.

Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.

Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.

Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas. Evite contaminar as amostras e componentes do kit com micróbios e nucleases (DNase/RNase).

As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.

Não substitua ou combine os componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) de um lote de um kit com os componentes de outro lote.

O kit de teste pode ser usado por 8 semanas após a primeira abertura (o kit pode ser recarregado até 6 vezes). Não use o kit de teste após o prazo de validade. Estas especificações também são verificadas pelo sistema RIDA<sup>®</sup>UNITY.

Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Mais detalhes sobre as Folhas de Dados de Segurança (Safety Data Sheet, SDS) podem ser encontrados sob o número do item em <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para usuários na União Europeia: Comunicar todos os eventos adversos graves associados ao produto à R-Biopharm AG e às autoridades nacionais competentes.

O resumo de segurança e desempenho (SSP) deste produto estará disponível em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> assim que a Base de Dados Europeia de Dispositivos Médicos (EUDAMED) for iniciada. Na base de dados, procure o dispositivo usando o UDI-DI localizado na embalagem externa do dispositivo.

## 8. Coleta e armazenamento de amostras

Recomenda-se a utilização de material de amostra fresca para obter o melhor desempenho possível do ensaio RIDA®UNITY EHEC/EPEC.

Evite congelar e descongelar repetidamente a amostra.

Não colete as amostras de fezes em recipientes de transporte que contenham meios de transporte com conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, pois tais substâncias podem interferir com os testes RIDA®UNITY.

Recomenda-se produzir alíquotas das amostras para evitar o descongelamento e o congelamento repetidos. As amostras congeladas devem ser descongeladas imediatamente antes da extração para evitar a degradação dos ácidos nucleicos.

Siga as instruções de armazenamento das amostras nas Tabelas 3 a 6.

**Tab. 3:** Armazenamento de amostras - detecção de EHEC

Amostras nativas - fezes		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dias	≤ 7 dias	≤ 6 meses

Amostras nativas - cultura		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dia	≤ 1 dia	-

Em eluato (de fezes ou cultura)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 dias

Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C / -80 °C, o congelamento/descongelamento repetido da amostra de fezes até 5 vezes não afeta as propriedades do teste.

Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C, o congelamento/descongelamento repetido do eluato (de fezes ou cultura) de até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.

Não cultivar culturas de fezes previamente congeladas porque o congelamento afeta severamente as características de crescimento dos patógenos e isto pode potencialmente causar resultados falso-negativos.

**Tab. 4:** Armazenamento de amostras - detecção de STEC

<b>Amostras nativas - fezes</b>		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dias	≤ 7 dias	≤ 6 meses

<b>Amostras nativas - cultura</b>		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dia	≤ 1 dia	-

<b>Em eluato (de fezes ou cultura)</b>		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 dias

Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C / -80 °C, o congelamento/descongelamento repetido da amostra de fezes até 5 vezes não afeta as propriedades do teste.

Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C, o congelamento/descongelamento repetido do eluato (de fezes ou cultura) de até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.

Não cultivar culturas de fezes previamente congeladas porque o congelamento afeta severamente as características de crescimento dos patógenos e isto pode potencialmente causar resultados falso-negativos.

**Tab. 5:** Armazenamento de amostras - detecção de EPEC

<b>Amostras nativas - fezes</b>		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dias	≤ 7 dias	≤ 6 meses

<b>Amostras nativas - cultura</b>		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dia	≤ 1 dia	-

<b>Em eluato (de fezes ou cultura)</b>		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 dias

Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C / -80 °C, o congelamento/descongelamento repetido da amostra de fezes até 5 vezes não afeta as propriedades do teste.



Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C, o congelamento/descongelamento repetido do eluato (de fezes ou cultura) de até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.

Não cultivar culturas de fezes previamente congeladas porque o congelamento afeta severamente as características de crescimento dos patógenos e isto pode potencialmente causar resultados falso-negativos.

**Tab. 6:** Armazenamento de amostras - detecção de EIEC/*Shigella* spp.

Amostras nativas - fezes		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dia	≤ 7 dias	≤ 6 meses

Amostra nativa - cultura		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 1 dia	-

Em eluato (de fezes ou cultura)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 dias

Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C / -80 °C, o congelamento/descongelamento repetido da amostra de fezes até 5 vezes não afeta as propriedades do teste.

Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C, o congelamento/descongelamento repetido do eluato (de fezes ou cultura) de até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.

Não cultivar culturas de fezes previamente congeladas porque o congelamento afeta severamente as características de crescimento dos patógenos e isto pode potencialmente causar resultados falso-negativos.

### 8.1 Preparação de DNA a partir de amostras de fezes e cultura

Para isolar o DNA das amostras de fezes e cultura, use o RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Siga os procedimentos corretos de uso das instruções de utilização do RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (Seção: Preparação de ácido nucleico a partir de amostras de fezes; Seção: Preparação de ácido nucleico a partir de amostras de culturas).

## 9. Realização do teste

Coloque as amostras e os reagentes do RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC no sistema RIDA<sup>®</sup>UNITY no início da utilização.

Antes, misture adequadamente a **Reaction Mix**, **Negative Control** e **Positive Control** usando um agitador vortex. Não agite a **Enzyme Mix**. Em seguida, centrifugue brevemente todos os componentes.

Os tubos de PCR das amostras a serem examinadas devem ser posicionados antecipadamente no ciclador de PCR integrado.

Os processadores estão configurados para carregar corretamente o sistema com reagentes e consumíveis. Para o processo de abastecimento, siga as instruções do sistema RIDA<sup>®</sup>UNITY. Observe as seções relevantes no manual do sistema RIDA<sup>®</sup>UNITY (Seção: Realização da execução).

O teste RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC pode ser usado apenas em combinação com o kit de Controle Interno RIDA<sup>®</sup>UNITY. Isto permite o reconhecimento antecipado da potencial inibição da PCR, verificação da integridade do reagente e confirmação da extração bem-sucedida do ácido nucleico. O procedimento está descrito nas instruções de utilização do RIDA<sup>®</sup>UNITY Internal Control Kit (Seção: Realização do teste).

O processamento automatizado é descrito no manual do sistema RIDA<sup>®</sup>UNITY (Seção: Realização da execução).

## 9.1 Configurações do dispositivo

### 9.1.1 Perfil de PCR em tempo real universal

Para harmonizar os ensaios RIDA®UNITY, o ensaio RIDA®UNITY EHEC/EPEC foi verificado exclusivamente no perfil universal. Isto torna possível combinar os ensaios de DNA e RNA um com o outro. De maneira geral, a transcrição reversa, portanto, vem em primeiro lugar no perfil universal.

**Tab. 7:** Perfil universal de PCR em tempo real para o RIDA®UNITY

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Tempo máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

**Tab. 8:** Perfil de PCR em tempo real universal para o CFX96™ Dx

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Tempo máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

## 9.2 Configuração do canal de detecção

**Tab. 9:** Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Deteção	Canal de deteção	Indicação
<b>R-Biopharm RIDA®UNITY</b>	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK canal stx
	Controle Interno	HEX	SEEK canal ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK canal ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK canal eae
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK canal stx
	Controle Interno	VIC	SEEK canal ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK canal ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK canal eae

## 10. Controle de qualidade - indicação de instabilidade ou expiração de reagentes

As amostras são avaliadas usando o software analítico RIDA®SEEK do sistema RIDA®UNITY. O **Negative Control** e o **Positive Control** devem mostrar os resultados corretos (ver Tab. 9).

O **Positive Control** está presente em uma concentração de  $10^3$  cópias/ $\mu$ L. É usado em uma quantidade total de  $5 \times 10^3$  cópias em cada execução de PCR.

O **Negative Control** já contém o RIDA®UNITY Internal Control. Uma vez que os controles não contêm um modelo, nenhum sinal deve ser antecipado nos canais-alvo. Os sinais positivos no canal IC com o qual o controle interno é detectado são essenciais (ver Tab. 10).

**Tab.10:** Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	Resultado	IC Ct	Gene-alvo Ct
Controle positivo	+	N/D*	Ver Certificate of Analysis
Controle negativo	-	Ct > 20	0

\*Em determinadas circunstâncias, o canal IC pode ter um sinal positivo no controle positivo e, portanto, não deve ser avaliado.

Se o controle positivo não estiver dentro da faixa Ct especificada, mas o controle negativo for válido, todas as reações, incluindo os controles, precisam ser reanalisadas na PCR.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, todas as reações, incluindo os controles, precisam ser reanalisadas na PCR.

Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste

Se as condições ainda não forem cumpridas após repetir o teste, consulte o fabricante ou seu distribuidor local R-Biopharm.

## 11. Avaliação e interpretação

A avaliação e interpretação das amostras são feitas usando o software analítico do sistema RIDA<sup>®</sup>UNITY, o RIDA<sup>®</sup>SEEK.

Não existe atualmente nenhum método de referência ou material de referência reconhecido internacionalmente para padronização. Os materiais de controle são rastreáveis metrologicamente até o padrão interno da R-Biopharm AG com base em fragmentos amplificados de DNA específicos.

Para obter mais informações sobre rastreabilidade metrológica, entre em contato com a R-Biopharm AG.

Os valores especificados, intervalos e outros detalhes podem ser encontrados no Certificado de Análise (Certificate of Analysis, CoA) anexo.

**Tab.11:** Interpretação dos resultados\*

Detecção de				
<i>stx1/stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	IC	Resultado
+	-	-	+/-	STEC (EHEC) detectável
-	+	-	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detectável
-	-	+	+/-	EPEC detectável
+	+	-	+/-	STEC (EHEC) e EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detectáveis
+	-	+	+/-	EHEC detectável
-	+	+	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. e EPEC detectáveis
+	+	+	+/-	EHEC e EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detectáveis
-	-	-	+	Gene-alvo não detectável
-	-	-	-	Inválido

\*+= positivo  
- = negativo

A Lei de Proteção contra Infecções (IfSG) descreve o EHEC como a *E. coli* produtora de toxinas Shiga (STEC) que são patógenos humanos. Como uma definição exata de STEC patogênico humano não pode ser estabelecida neste momento, **cada** STEC é considerado um potencial EHEC.<sup>(5)</sup>

Uma amostra é positiva se a amostra de DNA e o Internal Control mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

A amostra também é positiva se o DNA da amostra mostrar um sinal de amplificação, mas nenhum sinal de amplificação puder ser visto para

o **Internal Control** no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control** não é necessária neste caso, porque as altas concentrações de fragmentos amplificados podem causar um sinal fraco ou ausente do **Internal Control**.

Uma amostra é negativa se a amostra de DNA não mostrar um sinal de amplificação, mas um sinal de amplificação for visível para o **Controle Interno** no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR e a extração antecipada pode ser excluída através da detecção do **Internal Control**.

Uma amostra é inválida se o DNA da amostra e o **Internal Control** não mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção. Existem inibidores na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração.

## 12. Limitações do método

1. O teste RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC detecta DNA para os fatores de virulência do EHEC, STEC, EPEC e EIEC/*Shigella* spp. em amostras de fezes humanas não tratadas e de cultura. Uma conexão entre o nível do valor Ct determinado e a ocorrência de sintomas clínicos graves não pode ser derivada disso. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sintomas clínicos como um todo.
2. O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado da análise biológica molecular, mas deve sempre levar em conta a história médica e os sintomas do paciente.
3. Este teste somente é aprovado para processamento automatizado usando o sistema RIDA<sup>®</sup>UNITY.
4. Este teste somente é validado para amostras de fezes e cultura.
5. Ao utilizar a matriz de cultura, não transfira o meio de ágar para a reação PCR, pois isso pode levar a potenciais interferências.
6. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequado ou carga de patógenos abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-negativos.
7. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados falsos negativos ou inválidos.
8. Como em todos os testes de diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, concentrações extremamente baixas das sequências-alvo que estão abaixo do limite de detecção (LoD 95 %) podem ser detectadas. Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
9. Mutações ou polimorfismos nos locais de ligação do iniciador ou da sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem levar a resultados falso-negativos usando o RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC.
10. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que os genes alvo (EHEC, *stx1/2*, *eae*; STEC, *stx1/2*; EPEC, *eae*; e EIEC/*Shigella* spp., *ipaH*) estão presentes.
11. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir as instruções do fabricante com precisão ao realizar o teste.



## 13. Características de desempenho

### 13.1 Características de desempenho clínico

O RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR foi comparado em um laboratório externo com um teste de referência com a marca CE baseado em 276 amostras de fezes de pacientes com sintomas de infecção gastrointestinal.

Os resultados mostram sensibilidade e especificidade muito altas na detecção de fatores de virulência de EHEC, STEC, EPEC, e EIEC/*Shigella* spp. sob uso do kit RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC.

**Tab. 12:** Detecção de *stx1/2* - amostras de fezes

		PCR de referência		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA <sup>®</sup> UNITY EHEC/EPEC - <i>stx1/2</i>	Positivo	122	0	122
	Negativo	5	149	154
	Total	127	149	276

Sensibilidade relativa (IC 95 %)	96,1 % (91,1 % - 98,7 %)
Especificidade relativa (IC 95 %)	100 % (97,6 % - 100 %)

**Tab. 13:** Detecção de *ipaH* - amostras de fezes

		PCR de referência		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA <sup>®</sup> UNITY EHEC/EPEC - <i>ipaH</i>	Positivo	65	0	65
	Negativo	0	211	211
	Total	65	211	276

Sensibilidade relativa (IC 95 %)	100 % (94,5 % - 100 %)
Especificidade relativa (IC 95 %)	100 % (98,3 % - 100 %)

**Tab. 14:** Detecção de *eae* - amostras de fezes

		PCR de referência		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>eae</i>	Positivo	179	0	179
	Negativo	4	93	97
	Total	183	93	276

Sensibilidade relativa (IC 95 %)	97,8 % (94,5 % - 100 %)
Especificidade relativa (IC 95 %)	100 % (96,1 % - 100 %)

## 13.2 Características de desempenho clínico

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

Uma amostra de controle positivo (amostras negativas de fezes, fortificadas ou usando uma amostra de cultura) foi medida em cinco etapas de diluição (em etapas de 0,25-log) para cada alvo com 20 réplicas por etapa em um lote para determinar o LoD. Isto foi seguido por uma análise de probit. Em seguida, o LoD calculado foi confirmado com 20 réplicas por alvo para a etapa/concentração da diluição calculada.

Para os testes foram utilizadas as seguintes estirpes:

- *stx1/stx2: Escherichia coli D3509* (O LoD para *stx2* foi determinado porque o *stx2* está associado à síndrome hemolítica urêmica.)
- *ipaH: Escherichia coli Fr1368*
- *eae: Escherichia coli DSM8695*

Para a detecção de EHEC, STEC, EPEC e EIEC/*Shigella* spp. DNA usando o ensaio RIDA®UNITY EHEC/EPEC no sistema UNITY, foram determinados os seguintes limites de detecção (LoD).

Os resultados dessas medições são mostrados na Tabela 15.

**Tab. 15:** Resultados do limite de detecção do teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC para alvos *stx1/2*, *ipaH*, e *eae*.

	Matriz	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Fezes	476.000 CFU/mL	5300 CFU/mL	125.000 CFU/mL
	Cultura	2130 CFU/mL	798 CFU/ml	2890 CFU/mL

\*CFU: Colony Forming Units

O LoD para *stx1/2* em amostras de fezes foi determinado em 476.000 CFU/mL.

O LoD para *ipaH* em amostras de fezes foi determinado em 5300 CFU/mL.

O LoD para *eae* em amostras de fezes foi determinado em 125.000 CFU/mL.

O LoD para *stx1/2* em amostras de cultura foi determinado em 2130 CFU/mL.

O LoD para *ipaH* em amostras de cultura foi determinado em 798 CFU/mL.

O LoD para *eae* em amostras de cultura foi determinado em 2890 CFU/mL.

Para o fluxo de trabalho aprimorado usando o CFX96™ Dx, esses valores de LoD foram confirmados sob a suposição de que nos mantemos em uma faixa de LoD de 2-3 vezes.

### 13.2.2 Especificidade analítica

#### Substâncias interferentes

A presença de inibidores de PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. Portanto, foram investigados os efeitos de várias substâncias que podem existir devido ao seu amplo uso para infecções gastrointestinais ou ocorrência generalizada nas amostras correspondentes. As substâncias que poderiam potencialmente influenciar significativamente os resultados do teste foram examinadas inicialmente em altas concentrações (o triplo da dose diária ou simulação do pior caso) em uma tela de interferência. Não foi encontrada nenhuma interferência para as substâncias listadas na Tabela 16.

**Tab. 16:** Substâncias potencialmente interferentes

Substância potencialmente interferente	Concentração
Comprimidos revestidos por película de Azitromicina ratiopharm® 500 mg (azitromicina)	0,75 % (p/v)
Sulfato de bário	18,5 % [v/v]
Cologran® adoçante líquido (sacarina + ciclamato)	1,3 % (p/v)
Sangue humano	5 % [v/v]
Comprimidos de carvão vegetal 250 mg (carvão vegetal)	6 % (p/v)
Loperamide-ratiopharm® aguda (loperamida)	0,02 % [v/v]
Mucina	5 % (p/v)
Ácido palmítico/esteárico	40 % (p/v)

## Reações cruzadas

Foram investigados vários organismos (bactérias, parasitas, fungos e vírus) que podem ser encontrados comumente na matriz das fezes. Os micro-organismos a serem investigados para este ensaio foram escolhidos porque ou eles ocorrem naturalmente em amostras de fezes, ou causam sintomas correspondentes como patógenos gastrointestinais. Foram utilizadas para análise culturas bacterianas (entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> CFU/mL), culturas fúngicas ou virais, sobrenadantes de culturas virais, isolados e padrões LGC para os organismos em questão.

O RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR é específico para EHEC, STEC, EPEC, e EIEC/*Shigella* spp. Não foram detectadas reações cruzadas com as seguintes espécies (ver Tab. 17):

**Tab. 17:** Organismos potencialmente reativos cruzados

Organismo	Resultado do teste*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adenovírus 40	-	-	-
Adenovirus 41, humano, estirpe Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
Astrovirus 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-	-

<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** Portland 1	-	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** WB Clone C6	-	-	-
<i>Giardia lamblia</i> **	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GI	-	-	-
Norovirus GII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (sorotipo Enteritidis)	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (sorotipo 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* são o mesmo organismo.

### 13.2.3 Precisão

A precisão do teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR foi determinada para os seguintes níveis de consideração.

Precisão *Intraensaio*: Determinação de 5 amostras de controle usando 20 réplicas cada uma no RIDA®UNITY sob condições idênticas.

Precisão *Interensaio*: Determinação de 5 amostras de controle em 20 execuções em duplicado em 10 dias de trabalho (2 execuções por dia) realizadas por técnicos diferentes em condições reprodutíveis.

Os testes de precisão *intra* e *interensaio* foram realizados utilizando três lotes diferentes.

Os coeficientes de variação obtidos para cada medição usando o teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR no RIDA®UNITY e no CFX96™ Dx foram de 4,29 %.

**Tab. 18:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC para amostras de fezes *stx1/2* (sistema RIDA®UNITY).

Ct	Valor médio / CV	<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
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/D	N/D	N/D	2,15 %	2,23 %	2,26 %	2,28 %
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	CV (%)	2,34 %	2,05 %	2,13	N/D	N/D	N/D	N/D

**Tab. 19:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC para *stx1/2* a partir de amostras de fezes (CFX96™ Dx).

Ct	Valor médio / CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
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/D	N/D	N/D	2,96 %	2,90 %	2,76 %	3,04 %
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	CV (%)	1,52 %	1,59 %	3,43 %	N/D	N/D	N/D	N/D

**Tab. 20:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC para *ipaH* a partir de amostras de fezes (sistema RIDA®UNITY).

Ct	Valor médio / CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
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/D	N/D	N/D	1,44 %	1,34 %	1,45 %	1,42 %
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	CV (%)	0,88 %	0,77 %	0,69 %	N/D	N/D	N/D	N/D



**Tab. 21:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC para *ipaH* a partir de amostras de fezes (CFX96™ Dx).

Ct	Valor médio / CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
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/D	N/D	N/D	1,27 %	1,45 %	1,36 %	1,36 %
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	CV (%)	0,89 %	0,53 %	0,70 %	N/D	N/D	N/D	N/D

**Tab. 22:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC para eae a partir de amostras de fezes (sistema RIDA®UNITY).

Ct	Valor médio / CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
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/D	N/D	N/D	1,81 %	1,78 %	1,81 %	1,80 %
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	CV (%)	1,24 %	0,78 %	1,18 %	N/D	N/D	N/D	N/D

**Tab. 23:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY EHEC/EPEC para eae a partir de amostras de fezes(CFX96™ Dx).

Ct	Valor médio / CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
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/D	N/D	N/D	1,32 %	1,58 %	1,48 %	1,47 %
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	CV (%)	0,73 %	0,55 %	0,68 %	N/D	N/D	N/D	N/D

### 13.2.4 Reatividade analítica

A reatividade do teste RIDA<sup>®</sup>UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR em tempo real foi testada em um painel definido de estirpes de *E. coli* e *Shigella* (ver Tab. 24).

**Tab. 24:** Testes de reatividade analítica

Estirpe	Resultado*		
	<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>	-	+	-

\*+ = positivo (pelo menos 2 de 3 réplicas positivas)










- = negativo

## 14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2022-06-14	Versão da edição

## 15. Explicação dos símbolos

### Símbolos gerais

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Siga as instruções de uso
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

### Símbolos específicos do teste

	Mistura de reação
	Mistura de enzimas
	Controle negativo
	Controle positivo

## 16. Referências

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).