

RIDA® UNITY EHEC/EPEC

REF UN2205



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

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



0123

1. Predvidena uporaba

Za uporabo v *in vitro* diagnostiki. Test RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC, ki se izvaja na platformi RIDA[®]UNITY, je multipleksna preiskava PCR v realnem času za neposredno kvalitativno zaznavanje DNA za faktorje virulence EHEC, STEC, EPEC in EIEC/*Shigella* spp. v neobdelanih vzorcih blata oseb z znaki ter simptomi akutnega gastroenteritisa.

Test RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC je namenjen podpori pri diferencialnem diagnosticiranju okužb z *E. coli* (EHEC, EPEC, STAC in EIEC/*Shigella* spp.) pri bolnikih s simptomi gastroenteritisa v povezavi z drugimi kliničnimi in laboratorijskimi izvidi.

Negativni rezultati ne izključujejo okužbe z *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC ali EIEC/*Shigella* spp.), zato se ne smejo uporabiti kot edina osnova za diagnozo.

Izdelek je namenjen profesionalni uporabi.

2. Povzetek in razlaga testa

Diaroične bolezni so pomembna zdravstvena težava, saj povzročijo približno 1,7 milijarde primerov na leto pri otrocih po vsem svetu.⁽¹⁾ Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) so s približno 525.000 smrtmi na leto drugi vodilni vzrok smrti pri otrocih, mlajših od 5 let, predvsem v državah v razvoju.⁽¹⁾ En najpogostejših bakterijskih patogenov pri diaroičnih boleznih je *Escherichia coli*.⁽²⁾ *E. coli* je gramnegativna motilna bakterija, ki povzroča fermentacijo laktoze in spada v družino *Enterobacteriaceae*. Prisotna je v zdravih prebavilih, vendar lahko povzroča tudi diaroične bolezni z veliko obolevnostjo in umrljivostjo pri otrocih, predvsem v državah v razvoju. Na osnovi značilnosti virulence te bakterije, epidemiologije in klinične pojavne oblike so opredelili naslednje razrede diaroičnih *E. coli*: enteropatogeni *E. coli* (EPEC), enterotoksigeni *E. coli* (ETEC), enterohemoragični *E. coli* (EHEC), enteroinvazivni *E. coli* (EIEC) in enteroagregacijski *E. coli* (EAEC). Vse te diaroične oblike patogena *E. coli* se lahko prenašajo prek fekalno-oralne poti.⁽³⁾

Izmed patogenih *E. coli*, ki vplivajo na prebavila, ima še posebej pomembno vlogo enterohemoragični *E. coli* (EHEC). So podskupina bakterij *E. coli*, ki ustvarjajo toksin Shiga ali verotoksin (STEC oziroma VTEC). Patogenost STEC je mogoče izslediti v njihovi sposobnosti, da kolonizirajo črevesje, tako da se prilepijo na intersticijske epiteljske celice. Bakterije so po kolonizaciji sposobne ustvarjati dva citotoksina, verotoksin 1 in 2. Zaradi podobnosti verotoksinov s toksinom Shiga seva *Shigella dysenteriae*, se VTEC imenujejo tudi STEC. Drugi pomembni diagnostični dejavniki patogenosti EHEC nista samo *stx1/stx2* (gena toksina šigele), ampak tudi gen *eae* (za priključitev in odstranjevanje *E. coli*), ki kodira intimin, membranski protein. Ta membranski protein je odgovoren za priključitev patogena na epiteljske celice v prebavilih.⁽⁴⁾ Klinični simptomi, ki jih lahko pri ljudeh povzročijo EHEC/STEC so različni, od krvave driske do hemolitičnega uremičnega sindroma (HUS).^(2, 5) Viri okužbe so večinoma kontaminirana hrana, pri čemer manj kot 1000 bakterij

zadostuje za povzročitev okužbe EHEC/STEC. Najhujši, s hrano povezan izbruh, ki ga je STEC povzročil v Nemčiji, se je zgodil leta 2011. Med njim so ugotovili 3816 okužb s STEC in 54 smrti, od katerih jih je bilo 32 povezanih s HUS.⁽⁵⁾ Znano je, da enteropatogeni *E. coli* (EPEC) povzročajo pediatrične diaroične bolezni, predvsem v državah v razvoju.⁽³⁾ EPEC se lahko od EHEC razlikuje glede na odsotnost toksina šigele.⁽³⁾ Najpogostejši simptomi, povezani z okužbo z EPEC, so vodena driska, bolečina v trebuhu, slabost, bruhanje in vročina, medtem ko je kužni odmerek pri zdravih odraslih približno 10^8 organizmov.⁽⁵⁾ Enteroinvazivni *E. coli* (EIEC) in *Shigella* spp. prav tako povzročajo diaroične bolezni po celem svetu, predvsem v državah v razvoju. To so gramnegativne bakterije, ki si biokemično in genetsko tesno sorodne.⁽⁶⁾ Patogenost EIEC in *Shigella* spp. temelji na invaziji intersticijskih epitelijskih celic prek plazmidov in njihovem uničenju. Za ta proces so odgovorni produkti antigena invazivnega plazmida gena H (*ipaH*). Ta gen je pomemben za zaznavanje EIEC/*Shigella* spp., ki ju je mogoče tako razlikovati od EHEC. Izbruhi okužb EIEC/*Shigella* spp. so večinoma posledica prenosa s hrano in se kažejo z drisko, bolečino v trebuhu, slabostjo ter vročino.⁽⁶⁾

3. Načelo testa

Test RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC je multipleksna preiskava PCR v realnem času za neposredno zaznavanje in diferenciacijo EHEC, STEC, EPEC in EIEC/*Shigella* spp. v človeških vzorcih blata in kulturah.

Obdelava je popolnoma samodejna in poteka na sistemu RIDA[®]UNITY. Najprej se nukleinske kisline ekstrahirajo z uporabo kompletov RIDA[®]UNITY Universal Extraction Kit in Internal Control Kit.

Tarčno zaporedje se vedno zaznava v obliki RT-PCR v realnem času z enim korakom (tudi pri preiskavah DNA), tj. reverzna transkripcija (RT) in poznejši PCR se izvedeta v eni viali za reakcijo. Med postopkom se izolirana RNA (če je prisotna) s pomočjo reverzne transkriptaze prepíše v cDNA. Potem se specifični genski fragmenti faktorjev virulence *stx1/stx2*, *eae* in *ipaH* amplificirajo z metodo PCR v realnem času.

Ojačana tarčna zaporedja se zaznavajo s hidroliznimi sondami, označenimi z dušilcem na enem koncu in fluorescentnim poročevalskim barvilom (fluoroforom) na drugem koncu. V prisotnosti tarčnega zaporedja se sonde hibridizirajo do amplicona. Med podaljševanjem

polimeraza Taq loči poročevalca od dušilca. Poročevalec oddaja fluorescentni signal, ki ga zazna optična enota instrumenta za preiskavo PCR v realnem času.

Fluorescentni signal se poveča s količino ustvarjenih ampliconov. Komplet RIDA[®]UNITY Internal Control Kit je treba uporabljati sočasno, da je mogoče preverjanje priprave vzorca in/ali morebitnega zaviranja PCR.

4. Priloženi reagenti

Reagenti v kompletu zadostujejo za 96 določitev.*

Preglednica 1: Priloženi reagenti

REF	Reagent	Količina		Barva pokrovčka
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	rumena, pripravljeno za uporabo
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	rdeča, pripravljeno za uporabo
UNZ2205PC	Positive Control	1 ×	200 µL	modra, pripravljeno za uporabo
UNZ2205NC	Negative Control	1 ×	450 µL	bela, pripravljeno za uporabo

* Število reakcij je mogoče zmanjšati z večkratno uporabo in majhnimi serijami.

5. Navodila za shranjevanje

- Upoštevajte smernice za ravnanje v preglednici 2 in komplet shranite takoj po uporabi skladno z navedenimi informacijami.
- Vse reagente je treba shranjevati zaščitene pred svetlobo pri temperaturi od -16 °C do -28 °C. Če niso odprti, se lahko uporabljajo do roka uporabnosti, natisnjene na oznaki. Po izteku roka uporabnosti ni mogoče več jamčiti kakovosti.
- Vse reagente je treba pred uporabo popolnoma odtajati (npr. v hladilniku pri temperaturi 2–8 °C).
- Do 8-kratna ponovitev zamrzovanja in odtajanja ne vpliva na lastnosti testa.

Preglednica 2: Pogoji shranjevanja in podatki o shranjevanju

	Temperatura shranjevanja	Najdaljši čas shranjevanja
neodprto	-16 °C do -28 °C	Uporabi se lahko do natisnjene roka uporabnosti
odprto	-16 °C do -28 °C	8 ciklov zamrzovanja in odtajanja

6. Potrebni materiali, ki niso priloženi

Test RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR je namenjen samo uporabi skupaj s sistemom RIDA®UNITY. Za pravilno uporabo so nujni naslednji izdelki:

6.1 Reagenti

Za izvedbo testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC so potrebni naslednji reagenti:

Reagenti	Številka artikla
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Laboratorijska oprema

Za izvedbo testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC je potrebna naslednja oprema:

Oprema
Sistem RIDA®UNITY; kat. št.: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Potrošni material RIDA®UNITY (konice, ploščice, reakcijske vial, filmi). Za informacije o naročanju potrošnega materiala glejte navodila za uporabo sistema RIDA®UNITY.
Vrtinčni mešalnik
Namizna centrifuga
Rokavice za enkratno uporabo brez smukca
Zunanji ciklični termostat (morebitna nadgradnja sistema)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Komplet RIDA®UNITY EHEC/EPEC se lahko uporablja skupaj z drugimi združljivimi cikličnimi termostati. Druge instrumente za PCR v realnem času mora potrditi/validirati uporabnik. Če želite preveriti združljivost, se obrnite na družbo R-Biopharm AG na elektronski naslov pcr@r-biopharm.de.

7. Opozorila in previdnostni ukrepi za uporabnike

Za uporabo v *in vitro* diagnostiki.

Ta test sme izvajati samo kvalificirano laboratorijsko osebje. Upoštevati je treba smernice za delo v medicinskih laboratorijih.

Pri izvajanju tega testa vedno natančno upoštevajte uporabniški priročnik.

Vzorcev in reagentov ne pipetirajte z usti. Preprečite stik z razpokano kožo in sluznicami.

Pri ravnanju z reagenti in vzorci nosite osebno varovalno opremo (ustrezne rokavice, laboratorijsko haljo, varnostna očala) ter si po koncu testa umijte roke.

V prostorih ravnanja z vzorci ne kadite ter ne uživajte hrane in pijače.

Preprečite kontaminacijo vzorcev in komponent kompleta z mikrobi ter nukleazami (DNazo/RNazo).

Klinične vzorce je treba obravnavati kot morebitno kužne in jih je treba ustrezno zavreči, tako kot vse reagente in materiale, ki pridejo v stik z morebitno kužnimi vzorci.

Komponent (mešanice Reaction Mix, mešanice Enzyme Mix, kontrole Positive Control, kontrole Negative Control), ki pripadajo kompletu ene serije, ne zamenjajte in ne mešajte s komponentami v kompletu druge serije.

Testni komplet se lahko uporablja 8 tednov po prvem odprtju (komplet je mogoče znova naložiti 6-krat). Testnega kompleta ne uporabljajte po izteku roka uporabnosti. Te specifikacije preveri tudi sistem RIDA[®]UNITY.

Uporabniki so odgovorni za ustrezno odstranjevanje vseh reagentov in materiala po uporabi. Pri odstranjevanju upoštevajte nacionalne predpise.

Dodatne podrobnosti o varnostnem listu (Safety Data Sheet, SDS) najdete pod številko artikla na spletni strani <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Za uporabnike v Evropski uniji: O vseh resnih neželenih dogodkih, povezanih z izdelkom, poročajte družbi R-Biopharm AG in ustreznim nacionalnim organom.

Povzetek varnosti in učinkovitosti (SSP) za ta izdelek bo na voljo na spletnem mestu <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, ko bo vzpostavljena Evropska zbirka podatkov o medicinskih pripomočkih (EUDAMED). V zbirki podatkov pripomoček poiščite s kodo UDI-DI, ki je na zunanji ovojnini pripomočka.

8. Pridobivanje in shranjevanje vzorcev

Za doseganje najboljšega možnega delovanja preiskave RIDA®UNITY EHEC/EPEC je priporočljivo uporabiti material svežega vzorca.

Preprečite večkratno odtajanje in zamrzovanje vzorca.

Vzorci blata se ne smejo odvzeti v transportne vsebnike, ki vsebujejo transportno sredstvo s konzervansi, živalskimi serumi, kovinskimi ioni, oksidacijskimi sredstvi ali detergenti, saj lahko take snovi motijo teste RIDA®UNITY.

Priporočljivo je ustvariti alikvote vzorcev, da se izognete večkratnemu odtajanju in zamrzovanju. Zamrznjene vzorce je treba odtajati tik pred ekstrakcijo, da se prepreči degradacija nukleinskih kislin.

Upoštevajte navodila za shranjevanje vzorcev v preglednicah od 3 do 6.

Preglednica 3: Shranjevanje vzorcev – zaznavanje EHEC

Nativni vzorci – blato		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dni	≤ 7 dni	≤ 6 mesecev

Nativni vzorci – kultura		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dan	≤ 1 dan	-

V eluatu (iz blata ali kulture)		
30 °C	2–8 °C	-20 °C
≤ 24 ur	≤ 36 ur	≤ 7 dni

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C / -80 °C do 5-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja vzorca blata ne vpliva na lastnosti testa.

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C, do 3-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja eluata (iz blata ali kulture) ne vpliva na lastnosti testa.

Kultur ne gojite s predhodno zamrznjenim blatom, saj zamrzovanje močno vpliva na značilnosti rasti patogenov, kar lahko privede do lažno negativnih rezultatov.

Preglednica 4: Shranjevanje vzorcev – zaznavanje STEC

Nativni vzorci – blato		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dni	≤ 7 dni	≤ 6 mesecev

Nativni vzorci – kultura		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dan	≤ 1 dan	-

V eluatu (iz blata ali kulture)		
30 °C	2–8 °C	-20 °C
≤ 24 ur	≤ 36 ur	≤ 7 dni

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C / -80 °C do 5-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja vzorca blata ne vpliva na lastnosti testa.

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C, do 3-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja eluata (iz blata ali kulture) ne vpliva na lastnosti testa.

Kultur ne gojite s predhodno zamrznjenim blatom, saj zamrzovanje močno vpliva na značilnosti rasti patogenov, kar lahko privede do lažno negativnih rezultatov.

Preglednica 5: Shranjevanje vzorcev – zaznavanje EPEC

Nativni vzorci – blato		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dni	≤ 7 dni	≤ 6 mesecev

Nativni vzorci – kultura		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dan	≤ 1 dan	-

V eluatu (iz blata ali kulture)		
30 °C	2–8 °C	-20 °C
≤ 24 ur	≤ 36 ur	≤ 7 dni

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C / -80 °C do 5-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja vzorca blata ne vpliva na lastnosti testa.

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C, do 3-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja eluata (iz blata ali kulture) ne vpliva na lastnosti testa.

Kultur ne gojite s predhodno zamrznjenim blatom, saj zamrzovanje močno vpliva na značilnosti rasti patogenov, kar lahko privede do lažno negativnih rezultatov.

Preglednica 6: Shranjevanje vzorca – zaznavanje EIEC/ *Shigella* spp.

Nativni vzorci – blato		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dan	≤ 7 dni	≤ 6 mesecev

Nativni vzorec – kultura		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 1 dan	-

V eluatu (iz blata ali kulture)		
30 °C	2–8 °C	-20 °C
≤ 24 ur	≤ 36 ur	≤ 7 dni

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C / -80 °C do 5-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja vzorca blata ne vpliva na lastnosti testa.

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C, do 3-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja eluata (iz blata ali kulture) ne vpliva na lastnosti testa.

Kultur ne gojite s predhodno zamrznjenim blatom, saj zamrzovanje močno vpliva na značilnosti rasti patogenov, kar lahko privede do lažno negativnih rezultatov.

8.1 Priprava DNA iz vzorcev blata in kulture

Za izolacijo DNA iz vzorcev blata in kulture uporabite komplet RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Upoštevajte ustrezne postopke v navodilih za uporabo kompleta RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (poglavje: Priprava nukleinskih kislin iz vzorcev blata; poglavje: Priprava nukleinskih kislin iz vzorcev kulture).

9. Testni postopek

Ob začetku uporabe vzorce in reagente kompleta RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC postavite na sistem RIDA[®]UNITY.

Pred tem z vrtničnim mešalnikom ustrezno zmešajte izdelke **Reaction Mix**, **Negative Control** in **Positive Control**. Ne vrtničite izdelka **Enzyme Mix**. Potem na kratko centrifugirajte vse sestavine.

Epruvete PCR za vzorce, namenjene preiskavi, je treba pred tem postaviti v vgrajeni ciklični termostat PCR.

Za pravilno nalaganje reagentov in potrošnih materialov na sistem so na voljo nosilci. Za postopek nalaganja upoštevajte navodila sistema RIDA[®]UNITY. Upoštevajte ustrezna poglavja v priročniku sistema RIDA[®]UNITY (poglavje: Izvajanje analize).

Test RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC se sme uporabljati samo v kombinaciji s kompletom RIDA[®]UNITY Internal Control Kit. To omogoča zgodnje prepoznavanje možnega zaviranja PCR, potrjevanje neoporečnosti reagentov in potrjevanje uspešne ekstrakcije nukleinskih kislin. Postopek je opisan v navodilih za uporabo kompleta RIDA[®]UNITY Internal Control Kit (poglavje: Testni postopek).

Samodejna obdelava je opisana v priročniku sistema RIDA[®]UNITY (poglavje: Izvajanje analize).

9.1 Nastavitve pripomočka

9.1.1 Univerzalni profil preiskave PCR v realnem času

Za uskladitev analiz RIDA®UNITY se je test RIDA®UNITY EHEC/EPEC preveril izrecno v univerzalnem profilu. To omogoča medsebojno kombiniranje testov DNA in RNA. Na splošno je v univerzalnem profilu prva reverzna transkripcija.

Preglednica 7: Univerzalni profil preiskave PCR v realnem času za instrument RIDA®UNITY

<u>Reverzna transkripcija</u>	10 min, 58 °C
Prvotna denaturacija	1 min, 95 °C
Cikli	45 ciklov
<u>PCR</u> Denaturacija	10 s, 95 °C
Prileganje/podaljšanje	15 s, 60 °C
Hitrost prehoda temperature/ hitrost spremembe	Najdaljši čas

Opomba: Prileganje in podaljšanje se izvedeta med istim korakom.

Preglednica 8: Univerzalni profil preiskave PCR v realnem času za instrument CFX96™ Dx

<u>Reverzna transkripcija</u>	10 min, 58 °C
Prvotna denaturacija	1 min, 95 °C
Cikli	45 ciklov
<u>PCR</u> Denaturacija	15 s, 95 °C
Prileganje/podaljšanje	30 s, 60 °C
Hitrost prehoda temperature/ hitrost spremembe	Najdaljši čas

Opomba: Prileganje in podaljšanje se izvedeta med istim korakom.

9.2 Nastavitve kanala za zaznavanje

Preglednica 9: Izbira ustreznih kanalov za zaznavanje

Instrument za preiskave PCR v realnem času	Zaznavanje	Kanal za zaznavanje	Opomba
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK channel stx
	Internal Control	HEX	SEEK channel ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK channel ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK channel eae
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>stx1/stx2</i>	FAM	SEEK channel stx
	Internal Control	VIC	SEEK channel ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK channel ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK channel eae

10. Kontrola kakovosti – indikacija nestabilnosti ali poteka roka uporabnosti reagentov

Vzorci se ocenijo z analitično programsko opremo RIDA®SEEK sistema RIDA®UNITY. Kontroli **Negative Control** in **Positive Control** morata pokazati pravilne rezultate (glejte preglednico 9).

Kontrola **Positive Control** je na voljo v koncentraciji 10^3 kopij/ μ L. Pri vsaki preiskavi PCR se uporabi v skupni količini 5×10^3 kopij.

Kontrola **Negative Control** že vsebuje in interno kontrolo RIDA®UNITY Internal Control. Ker kontrole ne vsebujejo predloge, v tarčnih kanalih ni pričakovati signalov. Pozitivni signali v IC-kanalu, s katerimi se zazna interna kontrola, so nujni (glejte preglednico 10).

Preglednica 10: Veljavna preiskava PCR mora izpolnjevati naslednje pogoje:

Vzorec	Rezultat	IC Ct	Tarčni gen Ct
Pozitivna kontrola	+	/*	Glejte Certificate of Analysis
Negativna kontrola	-	Ct > 20	0

* V nekaterih primerih ima lahko IC-kanal pozitiven signal v pozitivni kontroli, zato ga ni treba oceniti.

Če pozitivna kontrola ni znotraj opredeljenega razpona Ct, negativna kontrola pa je veljavna, je treba vse reakcije, vključno s kontrolami, znova analizirati z metodo PCR.

Če negativna kontrola ni negativna, pozitivna kontrola pa je veljavna, je treba vse reakcije, vključno s kontrolami, znova analizirati z metodo PCR.

Če navedene vrednosti niso dosežene, pred ponovitvijo testa preverite naslednje:

- Rok uporabnosti pri uporabljenih reagentih.
- Funkcionalnost uporabljene opreme.
- Ustreznost testnega postopka.

Če po ponovitvi testa pogoji še vedno niso izpolnjeni, se posvetujte s proizvajalcem ali lokalnim distributerjem družbe R-Biopharm.

11. Ocenjevanje in interpretacija

Ocenjevanje in interpretacija vzorca se izvedeta z analitično programsko opremo sistema RIDA®UNITY, RIDA®SEEK.

Trenutno ni mednarodno priznane referenčne metode ali referenčnega materiala za standardizacijo. Kontrolni materiali so metrološko sledljivi do internih standardov družbe R-Biopharm AG, ki temeljijo na specifičnih amplikonih DNA.

Za dodatne informacije o metrološki sledljivosti se obrnite na družbo R-Biopharm AG.

Opređeljene vrednosti, območja in dodatne podrobnosti so v priloženem certifikatu (Certificate of Analysis, CoA).

Preglednica 11: Interpretacija rezultatov*

Zaznavanje				
<i>stx1/stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	IC	Rezultat
+	-	-	+/-	Zaznaven STEC (EHEC)
-	+	-	+/-	Zaznavna EIEC/ <i>Shigella</i> spp.
-	-	+	+/-	Zaznavna EPEC
+	+	-	+/-	Zaznavni STEC (EHEC) in EIEC/ <i>Shigella</i> spp.
+	-	+	+/-	Zaznavni EHEC
-	+	+	+/-	Zaznavni EIEC/ <i>Shigella</i> spp. in EPEC
+	+	+	+/-	Zaznavni EHEC in EIEC/ <i>Shigella</i> spp.
-	-	-	+	Tarčni geni niso zaznavni
-	-	-	-	Neveljavno

*+ = pozitivno

- = negativno

Zakon o zaščiti pred okužbami (IfSG) opisuje EHEC kot *E. coli* (STEC), ki tvori toksin šigele, in kot patogen pri človeku. Ker trenutno ni mogoče natančno opredeliti človeškega patogenega STEC, se **vsak** STEC obravnava kot morebiten EHEC.⁽⁵⁾

Vzorec je pozitiven, če DNA v vzorcu in kontrola **Internal Control** v sistemu za zaznavanje pokažeta signal amplifikacije.

Vzorec se prav tako obravnava kot pozitiven, če DNA v vzorcu pokaže signal amplifikacije, vendar na sistemu zaznavanja ni viden signal amplifikacije kontrole **Internal Control**. Zaznavanje kontrole **Internal Control** v tem primeru ni nujno, saj lahko velike koncentracije amplikonov povzročijo šibek ali odsoten signal kontrole **Internal Control**.

Vzorec se obravnava kot negativen, če DNA v vzorcu ne pokaže signala amplifikacije, vendar je na sistemu zaznavanja viden signal amplifikacije kontrole **Internal Control**. Z zaznavanjem **Internal Control** je mogoče izključiti zaviranje reakcije PCR pred ekstrakcijo.

Vzorec je neveljaven, če DNA v vzorcu in kontrola **Internal Control** v sistemu za zaznavanje ne pokažeta signala amplifikacije. V vzorcu so lahko prisotni zaviralci ali pa je med procesom ekstrakcije prišlo do napake.

12. Omejitve metode

1. Test RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC zaznava DNA za faktorje virulence EHEC, STEC, EPEC in EIEC/*Shigella* spp. v neobdelanih človeških vzorcih blata in kulture. Iz tega ni mogoče izpeljati povezave med stopnjo določene vrednosti Ct in pojavnostjo hudih kliničnih simptomov. Dobljene rezultate je treba vedno interpretirati v kombinaciji z vsemi kliničnimi simptomi.
2. Diagnoza ne sme temeljiti samo na rezultatu molekularne biološke analize, ampak mora vedno upoštevati bolnikovo zdravstveno anamnezo in simptome.
3. Ta test je odobren samo za samodejno obdelavo z uporabo sistema RIDA[®]UNITY.
4. Ta test je potrjen samo za vzorce blata in kulture.
5. Če uporabljate matriks kulture, gojišča z agarjem ne prenesite v reakcijo PCR, saj lahko privede do morebitnih motenj.
6. Nepravilno vzorčenje, transport, shranjevanje in ravnanje z vzorci ali obremenitev s patogeni pod analitično občutljivostjo testa lahko povzročijo lažno negativne rezultate.
7. Prisotnost zaviralcev PCR lahko privede do lažno negativnih ali neveljavnih rezultatov.
8. Kot pri vseh *in vitro* diagnostičnih testih na osnovi PCR je mogoče zaznati izjemno majhne koncentracije tarčnih zaporedij, ki so pod mejo zaznavnosti (LoD 95%). Dobljenih rezultatov ni vedno mogoče ponoviti.
9. Mutacije ali polimorfizmi na mestih vezave začetnika ali sonde lahko ovirajo zaznavanje novih ali neznanih variacij ter lahko povzročijo lažno negativne rezultate testa RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC.
10. Ni nujno, da pozitiven rezultat pomeni prisotnost viabilnih organizmov. Pozitivni rezultat pomeni prisotnost tarčnih genov (EHEC, *stx1/2*, *eae*; STEC, *stx1/2*; EPEC, *eae* in EIEC/*Shigella* spp., *ipaH*).
11. To preiskavo je treba izvajati skladno s predpisom o dobri laboratorijski praksi (DLP). Uporabniki morajo pri izvajanju testa natančno upoštevati navodila proizvajalca.

13. Lastnosti delovanja

13.1 Klinične lastnosti delovanja

Test RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR so v zunanjem laboratoriju primerjali z referenčnim testom z oznako CE na osnovi 276 vzorcev blata bolnikov s simptomi okužbe prebavil.

Rezultati kažejo zelo veliko občutljivost in specifičnost pri zaznavanju faktorjev virulence EHEC, STEC, EPEC in EIEC/*Shigella* spp. pri uporabi kompleta RIDA®UNITY EHEC/EPEC.

Preglednica 12: Zaznavanje *stx1/2* – vzorci blata

		Referenčni PCR		Skupno
		Pozitivno	Negativno	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC – <i>stx1/2</i>	Pozitivno	122	0	122
	Negativno	5	149	154
	Skupno	127	149	276

Relativna občutljivost (95-% IZ)	96,1% (91,1–98,7%)
Relativna specifičnost (95-% IZ)	100% (97,6–100%)

Preglednica 13: Zaznavanje *ipaH* – vzorci blata

		Referenčni PCR		Skupno
		Pozitivno	Negativno	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC – <i>ipaH</i>	Pozitivno	65	0	65
	Negativno	0	211	211
	Skupno	65	211	276

Relativna občutljivost (95-% IZ)	100% (94,5–100%)
Relativna specifičnost (95-% IZ)	100% (98,3–100%)

Preglednica 14: Zaznavanje *eae* – vzorci blata

		Referenčni PCR		Skupno
		Pozitivno	Negativno	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC – <i>eae</i>	Pozitivno	179	0	179
	Negativno	4	93	97
	Skupno	183	93	276

Relativna občutljivost (95-% IZ)	97,8% (94,5–100%)
Relativna specifičnost (95-% IZ)	100% (96,1–100%)

13.2 Analitične lastnosti delovanja

13.2.1 Meja zaznavnosti (LoD 95%)

Za določanje meje zaznavnosti so pozitivni kontrolni vzorec (negativni vzorci blata, zmešani ali z uporabo vzorca kulture) izmerili v petih korakih redčenja (v korakih po 0,25 log) za vsako tarčo z 20 ponovitvami na korak znotraj ene serije. Temu je sledila analiza probit. Izračunana meja LoD je bila potrjena z 20 ponovitvami na tarčo za izračunan korak/koncentracijo redčenja.

Pri testiranju so uporabili naslednje seve:

- *stx1/stx2*: *Escherichia coli* D3509 (določila se je vrednost LoD za *stx2*, ker je bil *stx2* povezan s hemolitičnim uremičnim sindromom.)
- *ipaH*: *Escherichia coli* Fr1368
- *eae*: *Escherichia coli* DSM8695

Pri zaznavanju EHEC, STEC, EPEC in EIEC/*Shigella* spp. DNA z uporabo preiskave RIDA®UNITY EHEC/EPEC na sistemu UNITY so določili naslednje meje zaznavnosti (LoD).

Rezultati teh meritev so prikazani v preglednici 15.

Preglednica 15: Rezultati za mejo zaznavnosti pri testu RIDA®UNITY EHEC/EPEC za tarče *stx1/2*, *ipaH* in *eae*.

	Matriks	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Blato	476.000 CFU/mL	5300 CFU/mL	125.000 CFU/mL
	Kultura	2130 CFU/mL	798 CFU/mL	2890 CFU/mL

* CFU: Colony Forming Units

LoD za *stx1/2* v vzorcih blata je bil določen pri 476,000 CFU/mL.

LoD za *ipaH* v vzorcih blata je bil določen pri 5300 CFU/mL.

LoD za *eae* v vzorcih blata je bil določen pri 125,000 CFU/mL.

LoD za *stx1/2* v vzorcih kulture je bil določen pri 2130 CFU/mL.

LoD za *ipaH* v vzorcih kulture je bil določen pri 798 CFU/mL.

LoD za *eae* v vzorcih kulture je bil določen pri 2890 CFU/mL.

Pri nadgrajenem delovnem postopku s sistemom CFX96™ Dx so te vrednosti LoD potrdili na osnovi predvidevanja, da ostanemo znotraj 2- do 3-kratnega razpona LoD.

13.2.2 Analitična specifičnost

Motilci

Prisotnost zaviralcev PCR in motilcev lahko privede do lažno negativnih ali neveljavnih rezultatov. Zato so raziskali učinke različnih snovi, ki lahko obstajajo zaradi njihove obsežne uporabe pri okužbah prebavil ali obširne pojavnosti. Snovi, ki bi morda lahko pomembno vplivale na rezultate testov, so bile na začetku pregledane pri visokih koncentracijah (trojni dnevni odmerek ali simulacija najslabšega primera) v okviru presejanja zaradi motenj. Pri snoveh, navedenih v preglednici 16, niso ugotovili nobenih motenj.

Preglednica 16: Možni motilci

Možen motilec	Koncentracija
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg filmsko obložene tablete (azitromicin)	0,75% [m/v]
Barijev sulfat	18,5% [% vol.]
Cologran® tekoče sladilo (saharin + ciklamat)	1,3% [m/v]
Človeška kri	5% [% vol.]
Tablete z ogljem 250 mg (ogljje)	6% [m/v]
Loperamide-ratiopharm® akut (loperamid)	0,02% [% vol.]
Mucini	5% [m/v]
Stearinska/palmitinska kislina	40% [m/v]

Navzkrižne reakcije

Raziskali so različne organizme (bakterije, parazite, glive in viruse), ki so pogosti v matriksu blata. Mikroorganizme, raziskane pri tem testu, so izbrali zaradi njihove naravne pojavnosti v vzorcih blata ali ker povzročajo ustrezajoče simptome kot gastrointestinalni patogeni. Pri analizah so uporabili kulture bakterij (med 10^6 in 10^9 CFU/mL), kulture gliv ali virusov, supernatante virusnih kultur, izolate ali standarde LGC za zadevne organizme.

Test RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR je specifičen za EHEC, STEC, EPEC in EIEC/*Shigella* spp. Zaznali niso nobenih navzkrižnih reakcij z naslednjimi vrstami (glejte preglednico 17):

Preglednica 17: Morebitno navzkrižno reaktivni organizmi.

Organizem	Rezultat testa*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adenovirus 40	-	-	-
Adenovirus 41, humani, sev Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
Astrovirus 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> podvr. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> podvr. <i>lari</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bif fermentans</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 klon 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> (serotip Enteritidis)	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (serotip Typhimurium)	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-

* - = negativno

** *Giardia intestinalis* in *Giardia lamblia* sta isti organizem.

13.2.3 Natančnost

Natančnost testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR je bila določena z upoštevanjem naslednjega.

Natančnost *znotraj* testa: Določanje 5 kontrolnih vzorcev z uporabo 20 ponovitev na instrumentu RIDA®UNITY pri identičnih pogojih.

Natančnost *med* testi: Določanje 5 kontrolnih vzorcev pri 20 podvojenih izvedbah testa v 10 delovnih dneh (2 izvedbi na dan), ki so jih izvedli različni tehniki pri ponovljivih pogojih.

Testiranje za natančnost *znotraj* testa in natančnost *med* testi so izvedli z uporabo treh različnih serij.

Koeficienti variacije, pridobljeni za vsako meritev z uporabo testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR na sistemih RIDA®UNITY in CFX96™ Dx so bili 4,29%.

Preglednica 18: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC pri *stx1/2* v vzorcih blata (sistem RIDA®UNITY).

Ct	Srednja vrednost/ CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami
		Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 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 (%)	/	/	/	2,15%	2,23%	2,26%	2,28%
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	CV (%)	2,34%	2,05%	2,13	/	/	/	/

Preglednica 19: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC pri *stx1/2* v vzorcih blata (CFX96™ Dx).

Ct	Srednja vrednost/ CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami
		Serija kompleta 1	Serija kompleta 2	Serija kompleta 3	Serija kompleta 1	Serija kompleta 2	Serija kompleta 3	Serija kompleta 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 (%)	/	/	/	2,96%	2,90%	2,76%	3,04%
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	CV (%)	1,52%	1,59%	3,43%	/	/	/	/

Preglednica 20: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC pri *ipaHv* vzorcih blata (sistem RIDA®UNITY).

Ct	Srednja vrednost/ CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami
		Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 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 (%)	/	/	/	1,44%	1,34%	1,45%	1,42%
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	CV (%)	0,88%	0,77%	0,69%	/	/	/	/

Preglednica 21: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC pri *ipaH* v vzorcih blata (CFX96™ Dx).

Ct	Srednja vrednost/ CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami
		Serija kompleta 1	Serija kompleta 2	Serija kompleta 3	Serija kompleta 1	Serija kompleta 2	Serija kompleta 3	Serija kompleta 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 (%)	/	/	/	1,27%	1,45%	1,36%	1,36%
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	CV (%)	0,89%	0,53%	0,70%	/	/	/	/

Preglednica 22: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC pri eaev vzorcih blata (sistem RIDA®UNITY).

Ct	Srednja vrednost/ CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami
		Serija kompleta 1	Serija kompleta 2	Serija kompleta 3	Serija kompleta 1	Serija kompleta 2	Serija kompleta 3	Serija kompleta 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 (%)	/	/	/	1,81%	1,78%	1,81%	1,80%
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	CV (%)	1,24%	0,78%	1,18%	/	/	/	/

Preglednica 23: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC pri eae v vzorcih blata (CFX96™ Dx).

Ct	Srednja vrednost/ CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami
		Serija kompleta 1	Serija kompleta 2	Serija kompleta 3	Serija kompleta 1	Serija kompleta 2	Serija kompleta 3	Serija kompleta 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 (%)	/	/	/	1,32%	1,58%	1,48%	1,47%
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	CV (%)	0,73%	0,55%	0,68%	/	/	/	/

13.2.4 Analitična reaktivnost

Reaktivnost testa RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time RT-PCR so testirali z opredeljenim panelom sevov *E. coli* in *Shigella* (glejte preglednico 24).

Preglednica 24: Testiranje analitične reaktivnosti

Sev	Rezultat*		
	<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>	-	+	-

*+ = pozitivno (pozitivna najmanj 2 od 3 replikatov)










- = negativno

14. Zgodovina različic


Številka različice	Del in oznaka
2022-06-14	Različica izdaje

15. Razlaga simbolov

Splošni simboli

	Za uporabo v <i>in vitro</i> diagnostiki
	Upoštevajte navodila za uporabo
	Serijska številka
	Rok uporabnosti
	Temperatura shranjevanja
	Številka artikla
	Število testov
	Datum izdelave
	Proizvajalec

Za test specifični simboli

	Reakcijska mešanica
	Encimska mešanica
	Negativna kontrola
	Pozitivna kontrola

16. Reference

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).