

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



1. Avsedd användning

För *in vitro* -diagnostisk användning. Testet RIDA®UNITY EHEC/EPEC som utförs på plattformen RIDA®UNITY, är en multiplex direktanalys-PCR för direkt kvalitativ detektering av DNA för virulensfaktorer av EHEC, STEC, EPEC och EIEC/*Shigella* spp. i obehandlade mänskliga avföringsprover och odlingsprover från personer med tecken och symtom på akut gastroenterit.

RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testet är avsett att stödja differentialdiagnosen av *E. coli*-infektioner (EHEC, EPEC, STEC och EIEC/*Shigella* spp.) hos patienter med symtom på gastroenterit i kombination med andra kliniska fynd och laboratoriefynd.

Negativa resultat utesluter inte infektion med *E. coli* (EHEC, EPEC, STEC, or EIEC/*Shigella* spp.) och bör inte användas som enda grund för diagnosen.

Produkten är avsedd för yrkesmässig användning.

2. Sammanfattning och förklaring av testet

Diarrésjukdomar är ett betydande hälsoproblem för barn över hela världen med cirka 1,7 miljarder fall per år.⁽¹⁾ Enligt Världshälsoorganisationen (WHO) är dessa sjukdomar, med cirka 525 000 dödsfall per år, den näst största dödsorsaken för barn under fem år, särskilt i utvecklingsländer⁽¹⁾. En av de vanligaste bakteriella patogener av diarré är *Escherichia coli*.⁽²⁾

E. coli är en gramnegativ, laktosfermenterande, motil bakterie och tillhör familjen *Enterobacteriaceae*. Det är en normal invånare i mag-tarmkanalen, men kan också orsaka diarrésjukdomar med hög sjuklighet och dödlighet hos barn, särskilt i utvecklingsländer. Följande klasser av diarréframkallande *E. coli* identifierades baserat på bakteriens virulensegenskaper, epidemiologi och kliniska manifestationer: enteropatogena *E. coli* (EPEC), enterotoxinproducerande *E. coli* (ETEC), enterohemorragiska *E. coli* (EHEC), enteroinvasiva *E. coli* (EIEC) och enteroaggregativa *E. coli* (EaAggEC). Alla dessa diarrépatotyper av *E. coli* kan överföras via avföringsvägarna.⁽³⁾

Bland de tarmpatogena *E. coli* har den enterohemorragiska *E. coli* (EHEC) fått särskild betydelse. De är en undergrupp av shiga-toxinet eller verotoxinproducerande *E. coli* (STEC eller VTEC, respektive). Patogeniciteten hos STEC kan spåras till deras förmåga att kolonisera tarmen genom att ansluta sig till tarmens epitelceller. Efter kolonisering kan bakterien producera två cytotoxiner, verotoxin 1 och 2. På grund av likheten mellan verotoxinerna och Shiga-toxinet av *Shigella dysenteriae*, kallas VTEC också STEC. Andra viktiga diagnostiska EHEC-patogenitetsfaktorer är inte bara *stx1/stx2* (Shigatoxingener), utan också *eae*-genen (*E. coli*-fästande och utplånande gen), som kodar för intin, membranproteinet. Detta membranprotein ansvarar för att patogenet fäster vid tarmepitelcellerna.⁽⁴⁾ Kliniska symtom som kan orsakas av EHEC/STEC hos människor varierar från blodig diarré till hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS).^(2, 5) Infektionskällorna är främst kontaminerade livsmedel, medan färre än 1000 bakterier är tillräckligt för att orsaka en EHEC/STEC-infektion. Det värsta livsmedelsrelaterade utbrottet som orsakats av STEC i Tyskland hittills var

2011. Detta utbrott ledde till 3816 identifierade STEC-infektioner och 54 dödsfall, varav 32 förknippades med HUS.⁽⁵⁾

Enteropatogena *E. coli* (EPEC) är kända som en orsak till pediatrika diarrésjukdomar, särskilt i utvecklingsländer.⁽³⁾ EPEC kan särskiljas från EHEC genom frånvaro av shigatoxiner.⁽³⁾ De vanligaste symtomen vid en EPEC-infektion är vattnig diarré, buksmärta, illamående, kräkningar och feber, medan den infektiösa dosen hos friska vuxna är cirka 10^8 organismer.⁽⁵⁾

Enteroinvasiva *E. coli* (EIEC) och *Shigella* spp. orsakar också diarrésjukdomar i hela världen, särskilt i utvecklingsländer. De är båda gramnegativa bakterier som är biokemiskt och genetiskt närbesläktade med varandra.⁽⁶⁾ Patogeniciteten hos EIEC och *Shigella* spp. baseras på plasmidmedierad invasion i tarmepitelceller och deras förstörelse. Produkterna av invasionen, plasmid antigen H-gen (*ipaH*), är ansvariga för denna process. Denna gen är relevant för påvisandet av EIEC/*Shigella* spp. och kan därför särskiljas från ETEC. Utbrott av EIEC/*Shigella* spp.-infektioner anses huvudsakligen bero på föda och manifesteras med diarré, buksmärta, illamående och feber.⁽⁶⁾

3. Testprincip

RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC är en multiplex Realtids-PCR för direkt kvalitativ upptäckt och differentiering av gener för virulensfaktorerna EHEC, STEC, EPEC och EIEC/*Shigella* spp. i humana avförings- eller odlingsprover.

Bearbetningen är helt automatiserad med RIDA[®]UNITY-systemet. Först extraheras nukleinsyrorna med RIDA[®]UNITY Universal Extraction Kit och intern kontroll-satsen. Målsekvensen detekteras i RT-PCR-format i ett steg i realtid, (även med DNA-analyser), det vill säga omvänd transkription (RT) och efterföljande PCR utförs i en reaktionsflaska. I processen transkriberas det isolerade RNA:t (om det finns) till cDNA med hjälp av omvänt transkriptas. De specifika genfragmenten av virulensfaktorerna *stx1/stx2*, *eae* och *ipaH* förstärks sedan med PCR i realtid. De förstärkta målsekvenserna detekteras med hjälp av hydrolyssonder som är märkta med en släckning i ena änden och ett fluorescerande rapporteringsfärgämne (fluorofor) i den andra. Sonderna hybridiseras till amplikonen i närvaro av en målsekvens. Under förlängning,

Taq-polymeras separerar rapportören från utsläckaren. Rapportören avger en fluorescerande signal som detekteras av den optiska enheten i ett instrument för direktanalys-PCR. Den fluorescerande signalen ökar med mängden bildade amplikoner. RIDA[®]UNITY Internal Control Kit måste användas samtidigt för att kunna kontrollera provberedning och/eller potentiell PCR-inhibition.

4. Reagenser som ingår

Reagenserna i satsen är tillräckliga för 96 fastställningar*.

Tab. 1: Reagenser som ingår

REF	Reagens	Mängd		Lockfärg
UNZ2205RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	gul, klar för användning
UNZ2205EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	röd, klar för användning
UNZ2205PC	Positive Control	1 ×	200 µL	blå, färdiga för användning
UNZ2205NC	Negative Control	1 ×	450 µL	vit, färdiga för användning

*Vid upprepad användning och i mindre serier kan antalet reaktioner minskas.

5. Förvaringsanvisningar

- Följ riktlinjerna för hantering i tabell 2 och förvara satsen direkt efter användning enligt den angivna informationen.
- Testsatsen måste förvaras i ett mörkt utrymme i -16 °C till -28 °C och kan i oöppnat skick användas fram till utgångsdatumet på etiketten. Kvalitetsgarantin är inte längre giltig efter passerat utgångsdatum.
- Alla reagenser ska tinas försiktigt före användning (t.ex. i kylskåp vid 2 - 8 °C).
- Upprepad frysning och upptining upp till 8 gånger påverkar inte testegenskaperna.

Tab. 2: Förvaringsförhållanden och information

	Förvaringstemperatur	Maximal förvaringstid
oöppnad	-16 °C till -28 °C	Kan användas fram till angivet utgångsdatum
öppnad	-16 °C till -28 °C	8 frysnings- och upptiningscykler

6. Nödvändiga reagenser som inte medföljer

RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex RT-PCR-test i realtid är endast avsett för användning med RIDA®UNITY-systemet. Följande produkter är absolut nödvändiga för korrekt användning:

6.1 Reagenser

Följande reagenser behövs för att utföra RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testet:

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

6.2 Laboratorieutrustning

Följande utrustning behövs för att utföra testet RIDA®UNITY EHECEPEC:

Utrustning
RIDA®UNITY-system; artikelnummer: ZUNITY (R-Biopharm AG)
RIDA®UNITY förbrukningsartiklar (spetsar, plattor, reaktionsflaskor, filmer). Se bruksanvisningen för RIDA®UNITY-systemet, beställningsinformation för förbrukningsvaror.
Vortexblandare
Centrifug för bordsskiva
Puderfria engångshandskar

Extern brytare (möjlig systemförbättring)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Satsen RIDA®UNITY EHEC/EPEC kan användas tillsammans med andra kompatibla cykelenheter. Alternativa instrument för direktanalys-PCR måste verifieras/valideras av användaren. Vänligen kontakta R-Biopharm AG på pcr@r-biopharm.de för att kontrollera kompatibiliteten.

7. Varningar och försiktighetsåtgärder för användare

För *in vitro* -diagnostisk användning.

Det här testet får endast utföras av utbildad laboratoriepersonal. Riktlinjerna för arbete i medicinska laboratorier måste följas.

Följ alltid bruksanvisningen för detta test noggrant.

Pipettera inte prover eller reagenser med munnen. Undvik kontakt med skadad hud och slemhinnor.

Använd personlig skyddsutrustning (lämpliga handskar, labbrock, skyddsglasögon) vid hantering av reagenser och prover, och tvätta händerna efter avslutat test.

Rök, ät eller drick inte i områden där prover eller testreagenser hanteras.

Undvik att förorena proverna och komponenterna i kitet med mikrober och nukleaser (DNase/RNase).

Kliniska prover måste betraktas som potentiellt smittsamma och bortskaffas på lämpligt sätt, precis som alla reagenser och material som kommer i kontakt med potentiellt smittsamma prover.

Byt inte ut eller blanda komponenterna (Reaction Mix, Enzymmix, Positive Control, Negative Control) i en partisats med komponenterna i ett annat parti.

Testsatsen kan användas i 8 veckor efter första öppnandet (satsen kan laddas om upp till 6 gånger). Använd inte testsatsen efter utgångsdatumet. Dessa specifikationer kontrolleras också av RIDA®UNITY-systemet.

Användare är ansvariga för korrekt kassering av alla reagenser och material efter användning. Följ nationella förordningar om kassering.

Ytterligare information om säkerhetsdatablad (Safety Data Sheet, SDS) finns under artikelnumret på <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

För användare i Europeiska unionen: Rapportera alla allvarliga biverkningar som är förknippade med produkten till R-Biopharm AG och relevanta myndigheter.

Sammanfattningen av säkerhet och prestanda (SSP) för denna produkt kommer att finnas tillgänglig på <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> när den europeiska databasen för medicintekniska produkter (EUDAMED) kommer igång. I databasen söker du efter enheten med hjälp av den UDI-DI som finns på enhetens yttre förpackning.

8. Insamling och förvaring av prover

Det rekommenderas att använda färskt provmaterial för att uppnå bästa möjliga prestanda för analysen RIDA®UNITY EHEC/EPEC.

Undvik upprepad nedfrysning och upptining av provet.

Samla inte upp avföringsproverna i transportbehållare som innehåller transportmedier med konserveringsmedel, djurserum, metalljoner, oxiderande medel eller rengöringsmedel eftersom sådana ämnen kan störa testet RIDA®UNITY.

Vi rekommenderar att ni tar alikvoter av proverna för att undvika upprepad upptining och nedfrysning. Frysta prover ska tinas omedelbart före extraktion för att förhindra nedbrytning av nukleinsyran.

Följ förvaringsanvisningarna för prover i tabell 3 till 6.

Tab. 3: Provförvaring - EHEC-detektering

Naturliga prover - avföring		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dagar	≤ 7 dagar	≤ 6 månader

Naturliga prover - odling		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dag	≤ 1 dag	-

I eluat (från avföring eller odling)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 timmar	≤ 36 timmar	≤ 7 dagar

Vid en förvaringstemperatur på -20 °C / -80 °C påverkar upprepad nedfrysning/upptining av avföringsproverna i upp till 5 gånger inte testegenskaperna.

Vid en lagringstemperatur på -20 °C påverkar inte upprepad frysnings/upptining av eluatet (från avföring eller odling) upp till 3 gånger testegenskaperna.

Odlas inte från tidigare frusen avföring eftersom frysnings allvarigt påverkar tillväxtegenskaperna av patogener och detta kan potentiellt orsaka falskt negativa resultat.

Tab. 4: Provförvaring - STEC-detektering

Naturliga prover - avföring		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dagar	≤ 7 dagar	≤ 6 månader

Naturliga prover - odling		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dag	≤ 1 dag	-

I eluat (från avföring eller odling)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 timmar	≤ 36 timmar	≤ 7 dagar

Vid en förvaringstemperatur på -20 °C / -80 °C påverkar upprepad nedfrysning/upptining av avföringsproverna i upp till 5 gånger inte testegenskaperna.

Vid en lagringstemperatur på -20 °C påverkar inte upprepad frysning/upptining av eluatet (från avföring eller odling) upp till 3 gånger testegenskaperna.

Odlas inte från tidigare frusen avföring eftersom frysning allvarigt påverkar tillväxtegenskaperna av patogener och detta kan potentiellt orsaka falskt negativa resultat.

Tab. 5: Provförvaring - EPEC-detektering

Naturliga prover - avföring		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dagar	≤ 7 dagar	≤ 6 månader

Naturliga prover - odling		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dag	≤ 1 dag	-

I eluat (från avföring eller odling)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 timmar	≤ 36 timmar	≤ 7 dagar

Vid en förvaringstemperatur på -20 °C / -80 °C påverkar upprepad nedfrysning/upptining av avföringsproverna i upp till 5 gånger inte testegenskaperna.

Vid en lagringstemperatur på -20 °C påverkar inte upprepad frysning/upptining av eluatet (från avföring eller odling) upp till 3 gånger testegenskaperna.

Odlas inte från tidigare frusen avföring eftersom frysning allvarligt påverkar tillväxttegenskaperna av patogener och detta kan potentiellt orsaka falskt negativa resultat.

Tab. 6: Provförvaring - detektion EIEC/*Shigella* spp.

Naturliga prover - avföring		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 1 dag	≤ 7 dagar	≤ 6 månader

Naturligt prov - odling		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 1 dag	-

I eluat (från avföring eller odling)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 timmar	≤ 36 timmar	≤ 7 dagar

Vid en förvaringstemperatur på -20 °C / -80 °C påverkar upprepade nedfrysning/upptining av avföringsproverna i upp till 5 gånger inte testtegenskaperna.

Vid en lagringstemperatur på -20 °C påverkar inte upprepade frysning/upptining av eluatet (från avföring eller odling) upp till 3 gånger testtegenskaperna.

Odlas inte från tidigare frusen avföring eftersom frysning allvarligt påverkar tillväxttegenskaperna av patogener och detta kan potentiellt orsaka falskt negativa resultat.

8.1 DNA-beredning från avföringsprover och odlingsprover

För att isolera DNA från avföringsprover och odlingsprover, använd RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Följ de direkta procedurerna i bruksanvisningen för RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (avsnitt: Beredning av nukleinsyra från avföringsprover, avsnitt: Beredning av nukleinsyra från odlingsprover).

9. Testprocedur

Placera både proverna och reagenserna från RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC på RIDA[®]UNITY-systemet i början av användningen.

Blanda i förväg **Reaction Mix**, **Negative Control** och **Positive Control** med hjälp av en vortexmixer. Mixa inte **Enzyme Mix**. Centrifugera därefter kort alla komponenter. PCR-rören för de prover som skall undersökas skall placeras i förväg i den integrerade PCR-cykelenheten.

Bärare finns tillgängliga för korrekt laddning av reagenser och förbrukningsvaror i systemet. Följ RIDA[®]UNITY-systemets instruktioner för laddningsprocessen. Observera de relevanta avsnitten i handboken för RIDA[®]UNITY-systemet (Avsnitt: Utföra en körning).

Testet RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC får endast användas i kombination med RIDA[®]UNITY Internal Control Kit. Detta möjliggör tidig igenkänning av potentiell PCR-inhibition, verifiering av reagensintegritet och bekräftelse av framgångsrik nukleinsyraextraktion. Proceduren beskrivs i bruksanvisningen för RIDA[®]UNITY Internal Control Kit (avsnitt: Testprocedur).

Automatiserad bearbetning beskrivs i RIDA[®]UNITY-systemets bruksanvisning (Avsnitt: Utföra en körning).

9.1 Enhetsinställningar

9.1.1 Universell profil för direktanalys-PCR

För att harmonisera RIDA®UNITY-analyserna verifierades RIDA®UNITY EHEC/EPEC-analysen i den universella profilen. Detta gör det möjligt att kombinera DNA- och RNA-analyser med varandra. I stort sett kommer omvänd transkription därför först i den universella profilen.

Tab. 7: Universell profil för direktanalys-PCR för RIDA®UNITY

<u>Omvänd transkription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturering	1 min, 95 °C
Cykler	45 cykler
<u>PCR</u> Denaturering	10 sek, 95 °C
Glödning/förlängning	15 sek, 60 °C
Övergångshastighet för temperatur/ramphastighet	Maximal

Obs: Glödning och förlängning sker i samma steg.

Tab. 8: Universell Realtids-PCR-profil för CFX96™ Dx

<u>Omvänd transkription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturering	1 min, 95 °C
Cykler	45 cykler
<u>PCR</u> Denaturering	15 sek, 95 °C
Glödning/förlängning	30 sek, 60 °C
Övergångshastighet för temperatur/ramphastighet	Maximal

Obs: Glödning och förlängning sker i samma steg.

9.2 Inställningar för detekteringskanal

Tab. 9: Val av lämpliga detekteringskanaler

Instrument för direktanalys-PCR	Detektering	Detekteringskanal	Observera
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>stx1stx2</i>	FAM	SEEK kanal stx
	Intern kontroll	HEX	SEEK kanal ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK kanal ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK kanal eae
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>stx1stx2</i>	FAM	SEEK kanal stx
	Intern kontroll	VIC	SEEK kanal ICD
	<i>ipaH</i>	ROX	SEEK kanal ipaH
	<i>eae</i>	Cy5	SEEK kanal eae

10. Kvalitetskontroll – indikation på reagensernas instabilitet eller utgångsdatum

Proverna utvärderas med hjälp av den analytiska programvaran RIDA®SÖK för RIDA®UNITY-systemet. **Negative Control** och **Positive Control** måste visa rätt resultat (se flik. 9).

Positive Control finns i en koncentration på 10^3 kopior/ μ L. Det används i en total mängd av 5×10^3 kopior i varje PCR-körning.

Negative Control innehåller redan RIDA®UNITY Internal Control. Eftersom kontrollerna inte innehåller någon mall ska inga signaler förutses i målkanalerna. Positiva signaler i IC-kanalen med vilken den interna kontrollen detekteras är väsentliga (se flik. 10).

Tab.10: En giltig PCR-körning måste uppfylla följande villkor:

Prov	Resultat	IC Ct	Målgen Ct
Positive control	+	Ej tillämpligt *	Se Certificate of Analysis
Negativ kontroll	-	Ct >20	0

*Under vissa omständigheter kan IC-kanalen ha en positiv signal i plusreglaget och bör därför inte utvärderas.

Om den positiva kontrollen inte ligger inom det specificerade Ct-intervallet men den negativa kontrollen är giltig, måste alla reaktioner analyseras på nytt i PCR:et, inklusive kontrollerna.

Om den negativa kontrollen inte är negativ men den positiva kontrollen är giltig, måste alla reaktioner analyseras på nytt i PCR:et, inklusive kontrollerna.

Om de angivna värdena inte uppfylls, kontrollera följande punkter innan du upprepar testet:

- Utgångsdatum för de reagenser som används
- Funktionaliteten hos den utrustning som används
- Korrekt testprocedur

Om villkoren fortfarande inte är uppfyllda efter upprepning av testet, kontakta tillverkaren eller din lokala R-Biopharm-distributör.

11. Utvärdering och tolkning

Utvärdering och tolkning av prover görs med RIDA®UNITY-systemets analytiska programvara, RIDA®SEEK.

Det finns ingen aktuell internationellt erkänd referensmetod eller referensmaterial för standardisering. Kontrollmaterialet är metrologiskt spårbart från interna R-Biopharm AG-standarder baserat på specifika DNA-amplifikat.

För ytterligare information om metrologisk spårbarhet, kontakta R-Biopharm AG.

De angivna värdena, intervallen och ytterligare detaljer finns i analyscertifikatet (CoA).

Tab.11: Resultattolkning*

Detektering av				
<i>stx1stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	IC	Resultat
+	-	-	+/-	STEC (EHEC) detekterbar
-	+	-	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. påvisbara
-	-	+	+/-	EPEC påvisbara
+	+	-	+/-	STEC (EHEC) och EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detekterbar
+	-	+	+/-	EHEC påvisbara
-	+	+	+/-	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. Och EPEC-detekterbar
+	+	+	+/-	EHEC och EIEC/ <i>Shigella</i> spp. detekterbar
-	-	-	+	Målgener kan inte detekteras
-	-	-	-	Ogiltigt

*+= positivt

- = negativt

Infection Protection Act (IfSG) beskriver EHEC som shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC) som är mänskliga patogener. Eftersom en exakt definition av humant patogent STEC inte kan fastställas vid denna tidpunkt, betraktas **varje** STEC som ett potentiellt EHEC.⁽⁵⁾

Ett prov klassificeras som positivt om provets DNA och den Internal Control visar en förstärkningssignal i detekteringssystemet.

Ett prov klassificeras som negativt om provets DNA inte visar någon förstärkningssignal, men en förstärkningssignal för den Internal Control kan hittas i detektionssystemet. Detektering av den Internal Control är inte nödvändig i detta fall

eftersom höga amplikonkoncentrationer kan orsaka en svag eller frånvarande signal i den **Internal Control**.

Ett prov klassificeras som negativt om provets DNA inte visar någon förstärkningssignal, men en förstärkningssignal för den **Internal Control** kan hittas i detektionssystemet. Inhibition av PCR-reaktionen och tidigare extraktion kan uteslutas genom detektering av **Internal Control**.

Ett prov är ogiltigt om provets DNA och **Internal Control** inte visar någon förstärkningssignal i detekteringssystemet. Inhibitorer finns i provet eller så uppstod ett fel under extraktionsprocessen.

12. Metodens begränsningar

1. RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC-testet detekterar DNA för virulensfaktorerna för EHEC, STEC, EPEC och EIEC/*Shigella* spp. i obehandlade humana avförings- och odlingsprover. En korrelation mellan nivån av det fastställda Ct-värdet och förekomsten av allvarliga kliniska symtom kan inte härledas från detta. De resultat som uppnås måste alltid tolkas i kombination med alla kliniska symtom.
2. Diagnosen får inte enbart baseras på resultatet av den molekylärbio-logiska analysen, utan bör alltid ta hänsyn till patientens sjukdomshistoria och symtom.
3. Detta test är endast godkänt för automatisk bearbetning med RIDA[®]UNITY-systemet.
4. Detta test är endast validerat för avföringsprover och odlingsprover.
5. Vid användning av odlingsmatrisen, överför inte agarmediet till PCR-reaktionen eftersom detta kan leda till potentiell interferens.
6. Felaktig provtagning, transport, lagring och hantering eller en patogenbelastning under testets analytiska känslighet kan leda till falskt negativa resultat.
7. Förekomst av PCR-inhibitorer kan leda till falskt negativa eller ogiltiga resultat.
8. Liksom för alla PCR-baserade *in vitro*-diagnostiska tester kan extremt låga koncentrationer av målsekvenser, som ligger under detektionsgränsen (LoD 95 %), påvisas. De erhållna resultaten är inte alltid reproducerbara.
9. Mutationer eller polymorfismer på primer- eller sondbindningsställena kan störa detekteringen av nya eller okända varianter och kan leda till falskt negativa resultat vid användning av RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC.
10. Ett positivt testresultat indikerar inte nödvändigtvis förekomsten av livskraftiga organismer. Ett positivt resultat indikerar att målgener (EHEC, *stx1/2*, *eae*; STEC, *stx1/2*; EPEC, *eae*; och EIEC/*Shigella* spp., *ipaH*) finns.
11. Denna analys ska utföras i enlighet med förordningen om god laboratoriesed (GLP). Användarna måste följa tillverkarens anvisningar exakt när de utför testet.

13. Prestandaegenskaper

13.1 Kliniska prestandaegenskaper

RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR jämfördes i ett externt laboratorium med ett CE-märkt referenstest baserat på 276 avföringsprover från patienter med symtom på gastrointestinal infektion.

Resultaten visar mycket hög känslighet och specificitet vid detektering av virulensfaktorer för EHEC, STEC, EPEC och EIEC/*Shigella* spp. vid användning av RIDA®UNITY EHEC/EPEC-satsen.

Tab. 12: Påvisande av *stx1/2* - avföringsprover

		Referens-PCR		Totalt
		Positivt	Negativt	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>stx1/2</i>	Positivt	122	0	122
	Negativt	5	149	154
	Totalt	127	149	276

Relativ känslighet (95 % KI)	96,1 % (91,1 % - 98,7 %)
Relativ specificitet (95 % KI)	100 % (97,6 % - 100 %)

Tab. 13: Påvisande av *ipaH* - avföringsprover

		Referens-PCR		Totalt
		Positivt	Negativt	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>ipaH</i>	Positivt	65	0	65
	Negativt	0	211	211
	Totalt	65	211	276

Relativ känslighet (95 % KI)	100 % (94,5 % - 100 %)
Relativ specificitet (95 % KI)	100 % (98,3 % - 100 %)

Tab. 14: Påvisande av *eae* - avföringsprover

		Referens-PCR		Totalt
		Positivt	Negativt	
RIDA®UNITY EHEC/EPEC - <i>eae</i>	Positivt	179	0	179
	Negativt	4	93	97
	Totalt	183	93	276

Relativ känslighet (95 % KI)	97,8 % (94,5 % - 100 %)
Relativ specificitet (95 % KI)	100 % (96,1 % - 100 %)

13.2 Analytiska prestandaegenskaper

13.2.1 Detektionsgräns (LoD 95 %)

Ett positivt kontrollprov (negativa avföringsprov, spetsade eller med hjälp av ett odlingsprov) mättes i fem utspädningssteg (i 0,25-log-steg) för varje mål med 20 replikat per steg i en sats för att bestämma LoD. Detta följdes av en probitanalys. Därefter bekräftades beräknad LoD med 20 replikat per mål för det beräknade spädningssteget/koncentrationen.

Följande stammar användes för testning:

- *stx1/stx2*: *Escherichia coli* D3509 (LoD för *stx2* bestämdes eftersom *stx2* är associerad med hemolytiskt uremiskt syndrom.)
- *ipaH*: *Escherichia coli* Fr1368
- *eae*: *Escherichia coli* DSM8695

För detektion av EHEC, STEC, EPEC och EIEC/*Shigella* spp.DNA med användning av RIDA®UNITY EHEC/EPEC-analysen på UNITY-systemet bestämdes följande detektionsgränser (LoD).

Resultaten av dessa mätningar visas i tabell 15.

Tab. 15: Resultat av detektionsgränsen för RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testet för mål *stx1/2*, *ipaH* och *eae*.

	Matris	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
LoD	Avföring	476 000 CFU*/mL	5300 CFU*/mL	125 000 CFU*/mL
	Odling	2130 CFU*/mL	798 CFU*/mL	2890 CFU*/mL

*CFU: Colony Forming Units

LoD för *stx1/2* i avföringsprover bestämdes till 476 000 CFU/mL.

LoD för *ipaH* i avföringsprover bestämdes till 5300 CFU/ml.

LoD för *eae* i avföringsprover bestämdes till 125 000 CFU/mL.

LoD för *stx1/2* i odlingsprover bestämdes till 2130 CFU/mL.

LoD för *ipaH* i odlingsprover bestämdes till 798 CFU/mL.

LoD för *eae* i odlingsprover bestämdes till 2890 CFU/mL.

För det förbättrade arbetsflödet med CFX96™ Dx bekräftades dessa LoD-värden under antagandet att vi håller oss inom ett 2-3-faldigt LoD-område.

13.2.2 Analytisk specificitet

Störande ämnen

Förekomsten av direkta PCR-inhibitorer och interfererande ämnen kan leda till falskt negativa eller ogiltiga resultat. Därför undersöktes effekterna av olika substanser som kan förekomma på grund av deras utbredda användning för gastrointestinala infektioner eller utbredd förekomst i motsvarande prover.

Ämnen som potentiellt skulle kunna ha en betydande inverkan på testresultaten undersöktes initialt vid höga koncentrationer (tre gånger den dagliga dosen eller simulering av det värsta fallet) i en interferensbild.

Ingen interferens hittades för de ämnen som förtecknas i tabell 16.

Tab. 16: Potentiellt störande ämnen

Potentiellt störande ämne	Koncentration
Azitromycin- ratiopharm® 500 mg filmdragerade tabletter (azitromycin)	0,75 % [w/v]
Bariumsulfat	18,5 % [v/v]
Cologran® flytande sötningsmedel (sackarin + cyklamat)	1,3 % [w/v]
Människoblod	5 % [v/v]
Koltabletter 250 mg (kol)	6 % [w/v]
Loperamid-ratiopharm® akut (loperamid)	0,02 % [v/v]
Mucin	5 % [w/v]
Stearin-/palmitinsyra	40 % [w/v]

Korsreaktioner

Olika organismer (bakterier, parasiter, svampar och virus) som är vanligt förekommande i avföringsmatrisen undersöktes. De mikroorganismer som ska undersökas för denna analys valdes eftersom de antingen förekommer naturligt i avföringsprover, eller för att de orsakar motsvarande symtom som gastrointestinala patogener. Bakteriedlingar (mellan 10⁶ och 10⁹ CFU/mL), svamp- eller virusodlingar, supernatanter av viruskulturer, isolat och LGC-standarder för respektive organism användes för analyser.

RIDA[®]UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR är specifik för EHEC, STEC, EPEC och EIEC/*Shigella* spp. Inga korsreaktioner med följande arter upptäcktes (se Tab. 17):

Tab. 17: Potentiellt korsreaktiva organismer.

Organism	Testresultat*		
	<i>stx1/2</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Adenovirus 40	-	-	-
Adenovirus 41, humant, stam 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-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> (serotyp Enteritidis)	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (serotyp Typhimurium)	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-

* - = negativ

** *Giardia intestinalis* och *Giardia lamblia* är samma organism.

13.2.3 Precision

Precisionen för RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR-test bestämdes för följande nivåer av överväganden.

Intra-analysprecision: Bestämning av 5 kontrollprover med 20 replikat vardera i RIDA®UNITY under identiska förhållanden.

Inter-analysprecision: Bestämning av 5 kontrollprov i 20 omgångar i två omgångar på 10 arbetsdagar (2 omgångar per dag) som utförs av olika tekniker under reproducerbara förhållanden.

Tester av *intra*- och *inter*-analysprecision utfördes med tre olika partier.

De variationskoefficienter som erhöles för varje mätning med RIDA®UNITY EHEC/EPEC real-time PCR-test på RIDA®UNITY och CFX96™ Dx var 4,29 %.

Tab. 18: Resultat av precisionen hos RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testet för *stx1/2* från avföringsprover (RIDA®UNITY-systemet).

Ct	Medelvärde/ CV	<i>Intra</i> -analys			<i>Inter</i> -analys			<i>Inter</i> -parti
		Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - partier 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 (%)	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	2,15 %	2,23 %	2,26 %	2,28 %
5	Ct	32,5	31,9	32,1	-	-	-	-
	CV (%)	2,34 %	2,05 %	2,13	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt

Tab. 19: Resultat av precisionen hos RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testet för *stx1/2* från avföringsprover (CFX96™ Dx).

Ct	Medelvärde/ CV	Intra-analys			Inter-analys			Inter-parti
		Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - partier 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 (%)	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	2,96 %	2,90 %	2,76 %	3,04 %
5	Ct	29,6	29,5	29,6	-	-	-	-
	CV (%)	1,52 %	1,59 %	3,43 %	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt

Tab. 20: Resultat av precisionen hos RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testet för ipaH från avföringsprover (RIDA®UNITY-systemet).

Ct	Medelvärde/ CV	Intra-analys			Inter-analys			Inter-parti
		Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - partier 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 (%)	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	1,44 %	1,34 %	1,45 %	1,42 %
5	Ct	27,4	27,4	27,3	-	-	-	-
	CV (%)	0,88 %	0,77 %	0,69 %	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt

Tab. 21: Resultat av precisionen hos RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testet för ipaH från avföringsprover (CFX96™ Dx).

Ct	Medelvärde/ CV	Intra-analys			Inter-analys			Inter-parti
		Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - partier 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 (%)	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	1,27 %	1,45 %	1,36 %	1,36 %
5	Ct	26,9	26,8	26,7	-	-	-	-
	CV (%)	0,89 %	0,53 %	0,70 %	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt

Tab. 22: Resultat av precisionen hos RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testet för aea från avföringsprover (RIDA®UNITY-systemet).

Ct	Medelvärde/ CV	Intra-analys			Inter-analys			Inter-parti
		Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - partier 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 (%)	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	1,81 %	1,78 %	1,81 %	1,80 %
5	Ct	29,1	29,4	29,4	-	-	-	-
	CV (%)	1,24 %	0,78 %	1,18 %	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt

Tab. 23: Resultat av precisionen hos RIDA®UNITY EHEC/EPEC-testet för eae från avföringsprover (CFX96™ Dx).

Ct	Medelvärde/ CV	Intra-analys			Inter-analys			Inter-parti
		Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - parti 1	Sats - parti 2	Sats - parti 3	Sats - partier 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 (%)	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	1,32 %	1,58 %	1,48 %	1,47 %
5	Ct	29,1	29,3	29,2	-	-	-	-
	CV (%)	0,73 %	0,55 %	0,68 %	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt

13.2.4 Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten hos RIDA®UNITY EHEC/EPEC multiplex real-time PCR-test undersöktes på en definierad panel av *E. coli* och *Shigella* strains (se Tab. 24).

Tab. 24: Analytisk reaktivitetstestning

Stam	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 replikat positiva)










- = negativ

14. Versionshistorik





Versionsnummer	Avsnitt och benämning
2022-06-14	Utgivningsversion

15. Symbolförklaringar

Allmänna symboler

	För <i>in-vitro</i> -diagnostisk användning
	Följ bruksanvisningen
	Batchnummer
	Använd före
	Förvaringstemperatur
	Artikelnummer
	Antal tester
	Tillverkningsdatum
	Tillverkare

Testspecifika symboler

	Reaktionsblandning
	Enzymblandning
	Negativ kontroll
	Positiv kontroll

16. Referenser

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).