

# RIDA® GENE ETEC/EIEC

**REF** PG2225



## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA<sup>®</sup>GENE ETEC/EIEC è un test di PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa e la differenziazione diretta dei geni del fattore di virulenza di ETEC ed EIEC/*Shigella* spp. in campioni e colture di feci umane.<sup>1,2</sup> Il test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE ETEC/EIEC è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi delle infezioni gastrointestinali causate rispettivamente da *Escherichia coli* patogeni e da *Shigella* spp.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Gli *Escherichia coli* (*E. coli*) sono batteri a bastoncello, anaerobi facoltativi, Gram-negativi, che si muovono mediante flagelli peritrichi e appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae.

Gli *E. coli* fanno parte della normale flora intestinale degli esseri umani e di molti animali da allevamento e sono generalmente non patogeni. Alcuni ceppi di *E. coli* sono patogeni per l'uomo attraverso l'acquisizione di alcuni fattori di virulenza (ad esempio geni codificanti per le tossine).

I sei *E. coli* patogeni conosciuti, *E. coli* enteroemorragico (EHEC), *E. coli* enteropatogeno (EPEC), *E. coli* enterotossigeno (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroaggregante (EAEC) ed *E. coli* diffusamente aderente (DAEC) possono essere differenziati in base ai fattori di virulenza.<sup>1</sup>

*E. coli* enterotossigeno (ETEC) è un *E. coli* patogeno intestinale importante. L'ETEC è la causa più comune di diarrea del viaggiatore, che colpisce i visitatori dei paesi in via di sviluppo. Il 30-60 % dei casi di diarrea del viaggiatore è causato dall'ETEC.

L'11-16 % dei viaggiatori che rientrano da paesi in via di sviluppo risulta infetto da ETEC. Nei bambini di età inferiore ai 5 anni nei paesi in via di sviluppo, l'ETEC provoca circa 210 milioni di casi di diarrea e circa 380.000 decessi l'anno.<sup>2</sup>

L'ETEC presenta due importanti fattori di virulenza, in grado di produrre enterotossine termostabili (ST) e/o termolabili (LT). Il sintomo clinico causato dall'ETEC è la diarrea liquida in forma da lieve ad acuta, che regredisce senza alcuna terapia specifica. I casi potenzialmente letali di diarrea da ETEC colpiscono prevalentemente bambini appena svezzati nei paesi in via di sviluppo. Le fonti di infezione sono acqua e alimenti contaminati, mentre al momento si esclude la trasmissione da una persona all'altra.<sup>3</sup>

Gli *E. coli* enteroinvasivi (EIEC) sono responsabili di malattie simili alla shigellosi nei paesi in via di sviluppo e fra i viaggiatori che li frequentano. Dal punto di vista biochimico e genetico i ceppi di EIEC sono correlati a *Shigella* spp. Le caratteristiche patologiche di EIEC e *Shigella* spp. si basano sulla capacità plasmide-mediata di invadere e distruggere l'epitelio colonizzato.<sup>3</sup> La presenza del gene ipaH (invasion plasmid antigen H) consente di differenziare EIEC/*Shigella* spp. da ETEC. Si sconsiglia la differenziazione fra EIEC e *Shigella* spp., in quanto entrambi hanno la stessa rilevanza clinica. La shigellosi causata dall'EIEC è caratterizzata da dolore

addominale e diarrea liquida, talvolta sanguinolenta. Le fonti di infezione sono acqua e alimenti contaminati e la trasmissione da una persona all'altra.<sup>4</sup>

### 3. Principio del test

RIDA<sup>®</sup>GENE ETEC/EIEC è un test di PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e la differenziazione dei geni del fattore di virulenza di ETEC ed EIEC/*Shigella* spp. in campioni e colture di feci umane.

Dopo l'isolamento del DNA si passa all'amplificazione dei frammenti di gene specifici per l'enterotossina termolabile LT (elt), l'enterotossina termostabile ST (estA) e il gene ipaH (se presente). I target amplificati vengono rivelati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la Taq-Polymerase rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA<sup>®</sup>GENE ETEC/EIEC contiene un Internal Control DNA (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione del campione e per determinare la possibile inibizione della PCR.

### 4. Contenuto della confezione

**Tab. 1:** Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni).

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

### 5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongelare accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 - 8 °C).

- I reagenti possono sopportare fino a **20 cicli di congelamento/scongelo** senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati in ambiente freddo, in modo appropriato (2 - 8 °C).

## 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE ETEC/EIEC è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real-time elencati di seguito:

**Tab. 2:** Apparecchiature convalidate

<b>Piattaforme di estrazione</b>	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
bioMérieux	NucliSENS <sup>®</sup> easyMag <sup>®</sup>
<b>Strumenti per la PCR real-time</b>	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 480II, <b>LightCycler<sup>®</sup> 480 z</b>
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 <sup>™</sup>
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Avvertenze:** sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time diversi contattare R-Biopharm all'indirizzo [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA<sup>®</sup> GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler<sup>®</sup> 480II e LightCycler<sup>®</sup> 480 z

- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- **Acqua per PCR (grado bioscientifico, priva di nucleasi)**

## 7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in locali separati per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Raccolta e conservazione di campioni

### 8.1 Preparazione del campione da campioni di feci

Per l'isolamento del DNA da campioni di feci umane utilizzare un kit (ad es. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni di feci con acqua in rapporto 1:3. Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 x g per 30 sec. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA<sup>®</sup>GENE ETEC/EIEC contiene un **Internal Control DNA** che rileva l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione. L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

## 8.2 Preparazione del campione da colture

Per l'isolamento del DNA dalla coltura si raccomanda la seguente procedura: Dispensare 1 µl di acqua per PCR in una provetta di preparazione. Raccogliere le colonie con un'ansa da inoculo e sospenderle nell'acqua per PCR preparata. Tagliare o rompere il gambo dell'ansa da inoculo. Chiudere la provetta di preparazione ermeticamente e agitare vigorosamente per 60 secondi. Scaldare e agitare la provetta di preparazione a 95 °C per 10 minuti in un modulo riscaldante. Centrifugare per 1 minuto a 13.000 x g e applicare il surnatante come campione.

**Avvertenze: ripetere la fase di centrifugazione in caso di forte torbidità (se necessario).**

Il test RIDA®GENE ETEC/EIEC contiene un **Internal Control DNA** che rileva l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione. L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela campione-acqua per PCR e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10% a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tab. 3, Tab. 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l'**Internal Control DNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2-8 °C).

**Tab. 3:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Totale</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

**Tab. 4:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Totale</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

## 9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

**Controllo negativo:** dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Avvertenze:** se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

**Campione:** dispensare 5 µl di estratto di DNA nella Master Mix pre-pipettata.

**Controllo positivo:** dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Avvertenze:** e l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

## 9.3 Impostazione dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

**Tab. 5:** Profilo della PCR real-time del DNA per le serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

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

**Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.**

**Tab. 6:** Profilo PCR real-time DNA per Mx3005P, ABI 7500 e CFX96™

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

**Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.**

### 9.3.2 Profilo per PCR real-time universale

**Avvertenze:** il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA® GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

**Tab. 7:** Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler®

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

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tab. 8:** Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

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

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

## 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

**Tab. 9:** Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	LT	465/510	<b>È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)</b>
	ICD	533/580	
	ipaH	533/610	
	ST	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<b>LT</b>	<b>465/510</b>	<b>È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)</b>
	<b>ICD</b>	<b>540/580</b>	
	<b>ipaH</b>	<b>540/610</b>	
	<b>ST</b>	<b>618/660</b>	
Agilent Techn. Mx3005P	LT	FAM	<b>Controllare che non vi sia colorante di riferimento</b>
	ICD	HEX	
	ipaH	ROX	
	ST	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	LT	FAM	<b>Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno</b>
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	ST	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	LT	FAM	-
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	ST	Cy5	
Qiagen Rotogene Q	LT	Verde	<b>Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite</b>
	ICD	Giallo	
	ipaH	Arancione	
	ST	Rosso	

## 10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 10, Fig. 1, Fig. 2, Fig.3).

Il **Positive Control** di CD Toxin A/B ha una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu$ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie.

**Tab. 10:** Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA <sup>*1</sup>	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

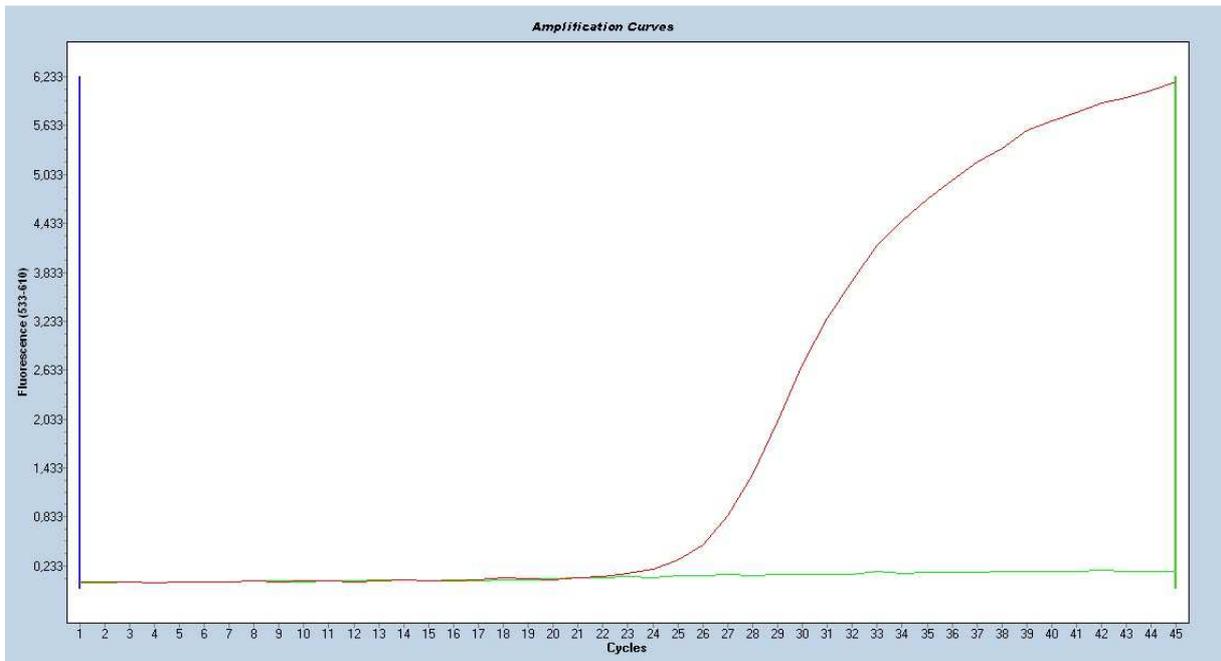
<sup>\*1</sup> Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICR.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

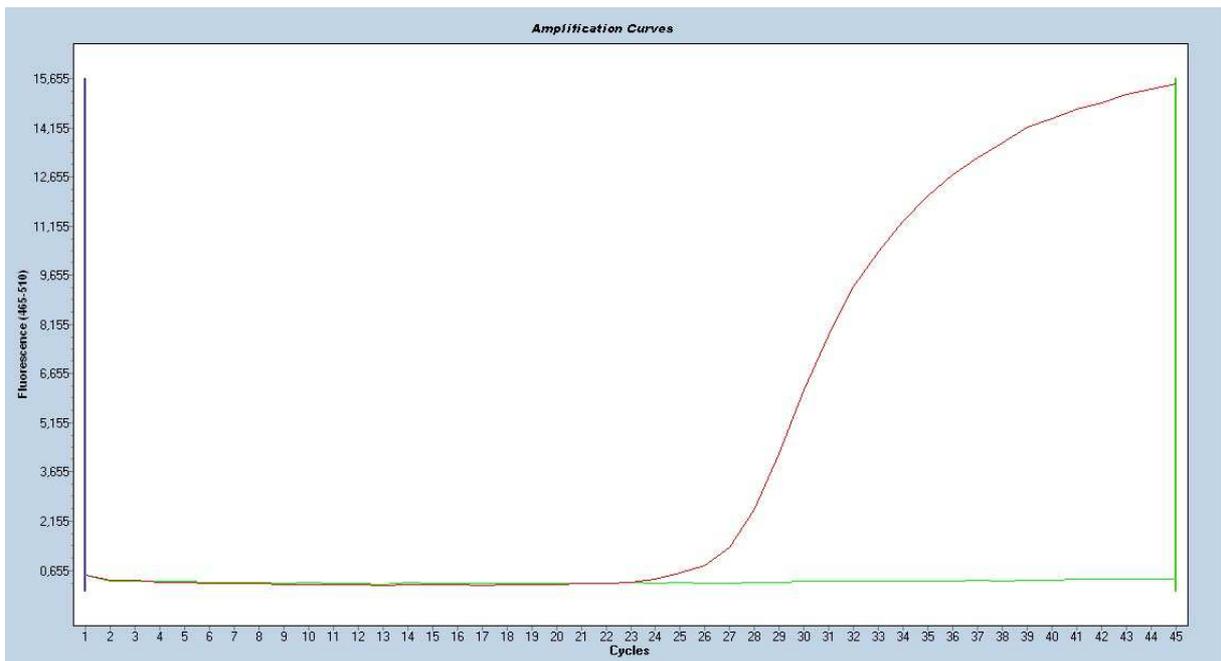
Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

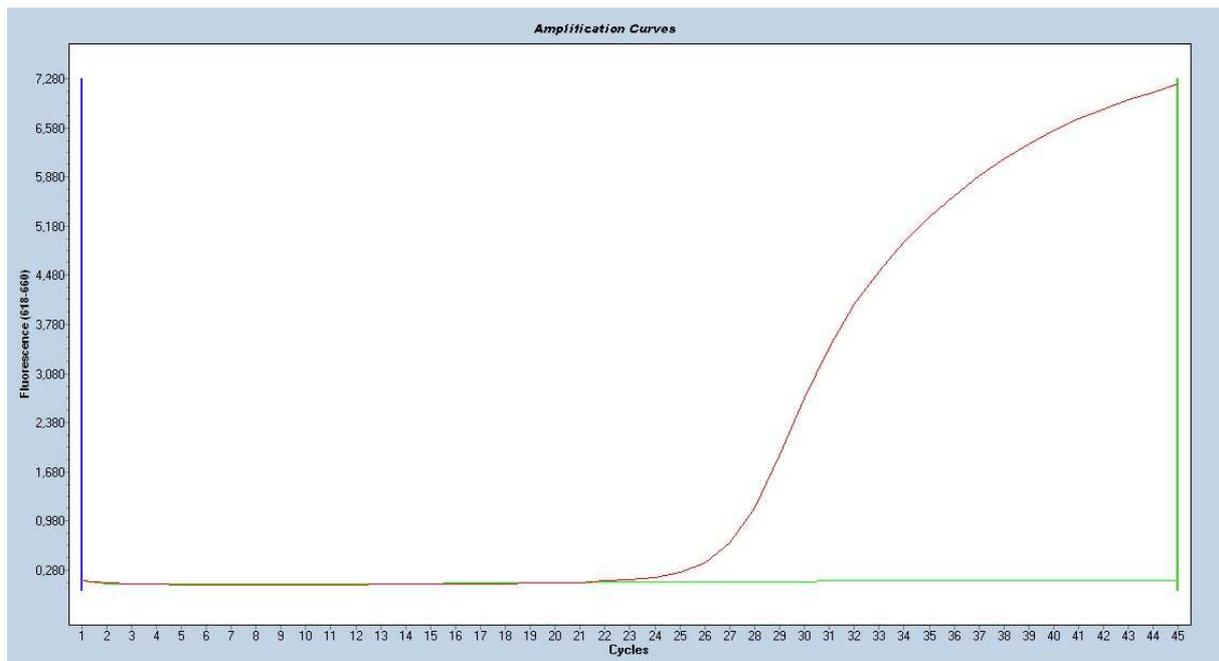
- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



**Fig. 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (gene LT) sul LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (gene ipaH) sul LightCycler® 480II



**Fig. 3:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (gene ST) sul LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tab. 11:** Interpretazione del campione

Geni del fattore di virulenza			ICD	Risultato
LT	ipaH	ST		
<b>positivo</b>	negativo	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>ETEC rivelato</b>
negativo	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>EIEC/Shigella spp. rivelato</b>
negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>ETEC rivelato</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>ETEC ed EIEC/Shigella spp. rivelati</b>
<b>positivo</b>	<b>negativo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>ETEC rivelato</b>
<b>negativo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>ETEC ed EIEC/Shigella spp. rivelati</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>ETEC ed EIEC/Shigella spp. rivelati</b>
negativo	negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>Gene target non rivelato</b>
negativo	negativo	negativo	negativo	<b>Non valido</b>

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

Un campione è valutato come positivo anche se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'**Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'**Internal Control DNA** sia debole o assente.

Un campione è valutato come negativo se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale di amplificazione per l'**Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'**Internal Control DNA** permette di escludere l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'**Internal Control DNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rilevazione. In questo caso il campione contiene un inibitore della PCR o si è verificato un errore nella procedura di estrazione. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

## 12. Limiti del metodo

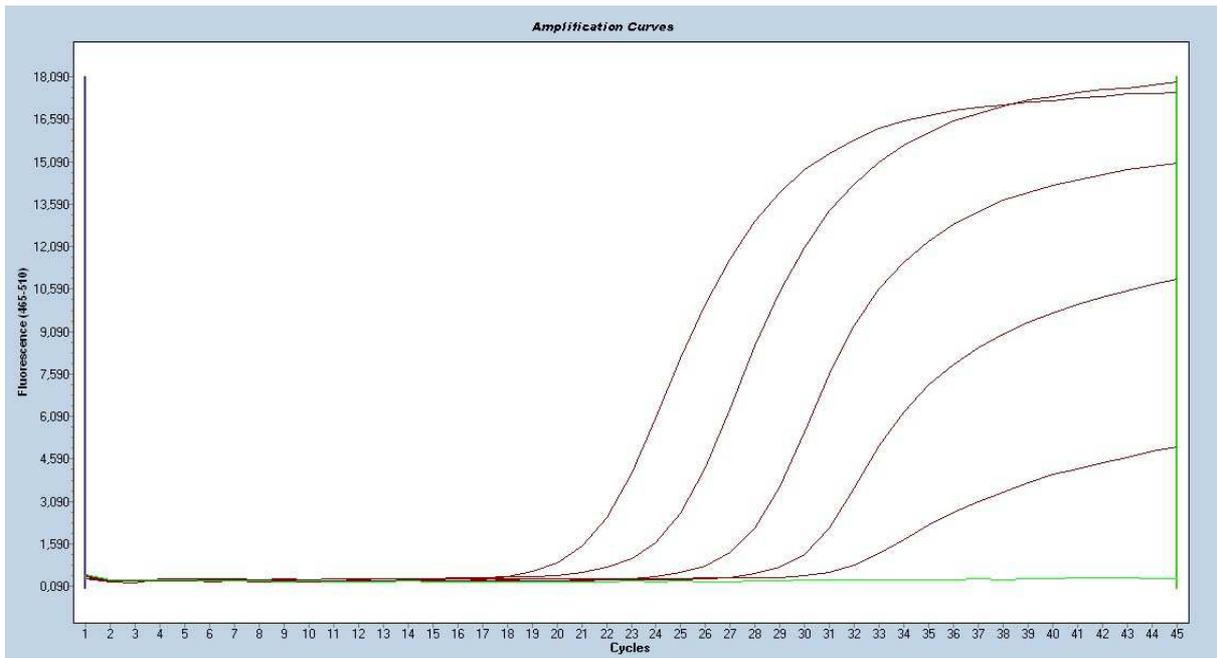
1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci e colture.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA<sup>®</sup>GENE ETEC/EIEC.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza dei geni target (elt, estA o ipaH).

## 13. Prestazioni e caratteristiche

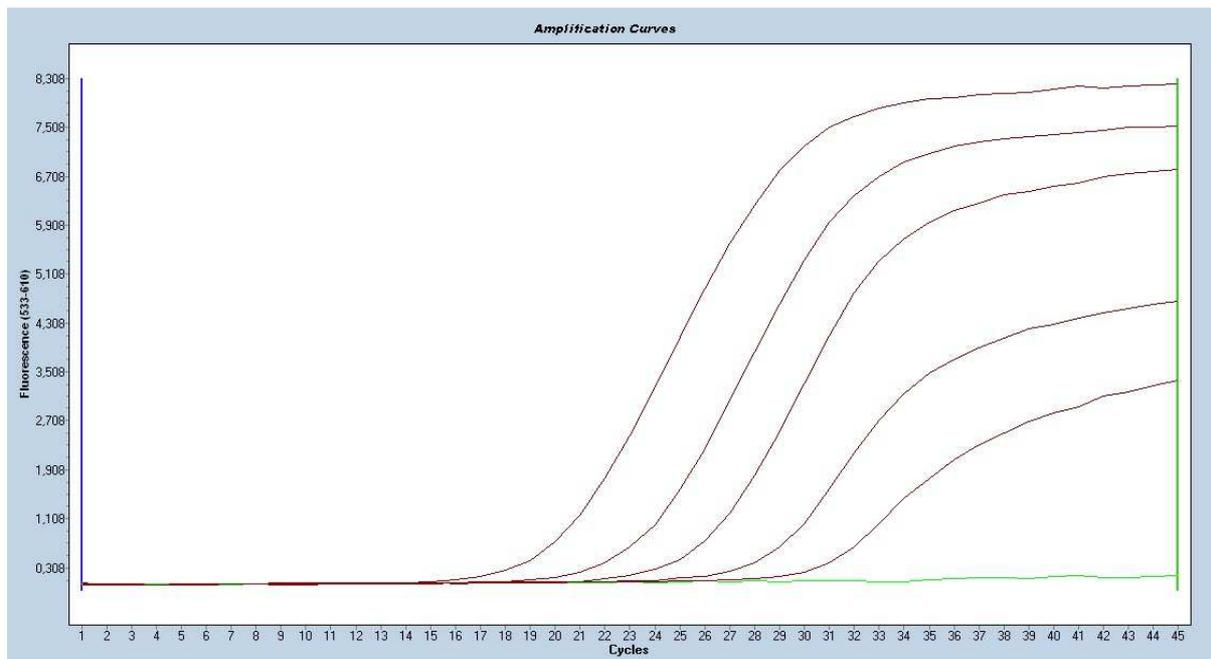
### 13.1 Sensibilità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA® GENE ETEC/EIEC ha un limite di rivelazione maggiore o uguale a 10 copie di DNA per reazione.

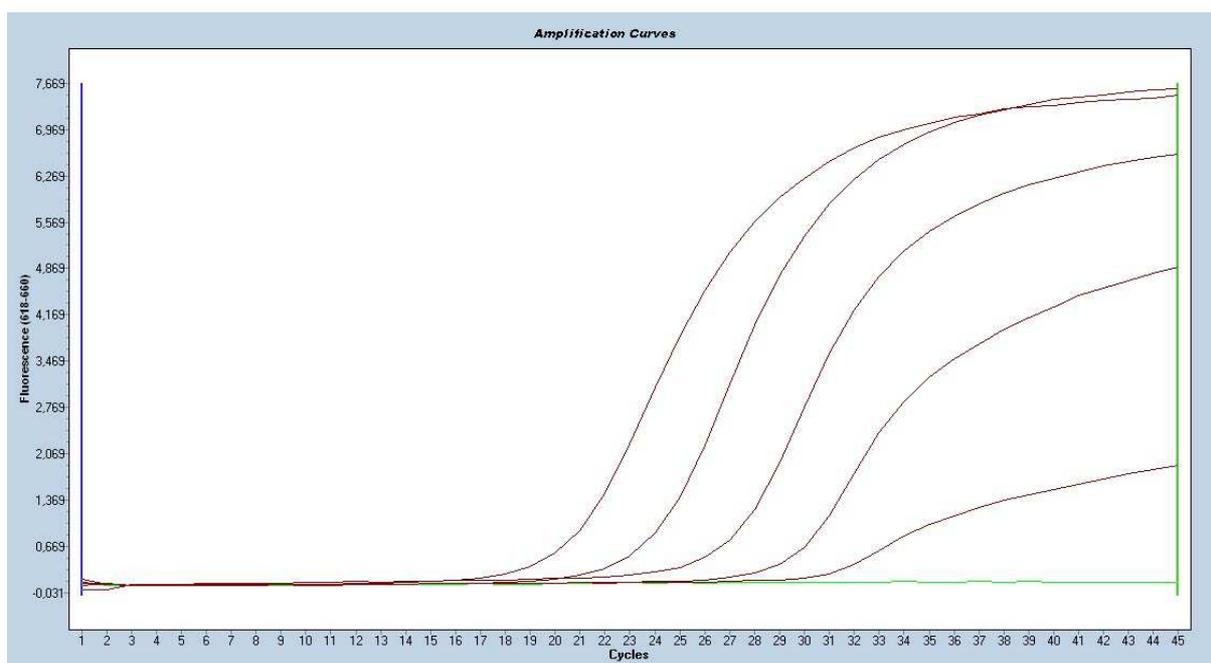
Le figure 4, 5 e 6 seguenti mostrano le serie di diluizioni del gene LT, ipaH e ST (10<sup>5</sup>-10<sup>1</sup> copie di DNA per µl ciascuno) sul LightCycler® 480II.



**Fig. 4:** Serie di diluizioni del gene LT (10<sup>5</sup> – 10<sup>1</sup> copie di DNA per µl) sul LightCycler® 480II



**Fig. 5:** Serie di diluizioni del gene ipaH ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig. 6:** Serie di diluizioni del gene ST ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

### 13.2 Specificità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA® GENE ETEC/EIEC è specifico per ETEC ed EIEC/*Shigella* spp. Non è stata individuata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab.12):

**Tab. 12:** Test di reattività crociata

Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rotavirus	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-		-		-

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2013-04-03	Versione di rilascio
2018-10-19	Revisione generale
2018-10-19	4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 11. Interpretazione del risultato 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

### Simboli specifici nel test

Non pertinente

## 16. Bibliografia

1. Kaper JM, *et al.* PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI. Nature Reviews Microbiology 2004; 2:123-140.
2. Steffen R, *et al.* Vaccination against enterotoxigenic Escherichia coli, a cause of travelers' diarrhea. J Travel Med 2006; 12:102-107
3. Nataro JP, *et al.* Diarrheagenic Escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews 1998; 11(1): 132-201.
4. Veira N, *et al.* High Prevalence of Enteroinvasive Escherichia Coli isolated in a remote region of Northern Coastal Ecuador. Am J Trop Med Hyg 2007, 76(3): 528-533.