



RIDA[®] GENE Hospital Stool Panel

REF PG0705



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germania
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel è un test RT-PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di norovirus (genogruppo I e II), rotavirus, e dei geni delle tossine A (tcdA)/B (tcdB) di *Clostridium difficile* in campioni fecali umani.

Il test RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time è adatto come ausilio nella diagnosi di gastroenterite nosocomiale.

2. Sintesi e spiegazione del test

La diarrea contratta in ospedale o diarrea nosocomiale è definita come episodio acuto di diarrea dopo 72 ore di ospedalizzazione (regola dei 3 giorni). Le cause della diarrea nosocomiale possono essere infettive o non infettive (ad esempio farmaci o chemioterapia); la condizione colpisce fino a un terzo dei pazienti ospedalizzati. La causa infettiva più comune di diarrea nosocomiale è il *Clostridium difficile*. Oltre a *Clostridium difficile* altre cause infettive predominanti sono norovirus e rotavirus. La diarrea nosocomiale può causare gravi complicanze nei pazienti e aumentare la durata e i costi della degenza ospedaliera.^{1,2,3,4}

I norovirus sono la principale causa della maggior parte dei focolai epidemici di gastroenterite non batterica.^{5,6,7} Una gastroenterite causata da norovirus si manifesta con nausea, vomito e diarrea. I norovirus sono escreti nelle feci e con il vomito. La trasmissione aerogena attraverso aerosol infetti è spesso la causa della rapidissima diffusione di questi virus nelle strutture condivise.^{8,9,10} Il Center for Disease Control (CDC, Atlanta, USA) stima che ogni anno negli Stati Uniti oltre 21 milioni di casi di gastroenterite acuta, 70.000 ricoveri e 800 decessi siano provocati da infezioni da norovirus.¹¹ I norovirus appartengono alla famiglia dei Caliciviridae e sono piccoli virus senza involucro con RNA a filamento singolo (ssRNA). Possono essere raggruppati in 7 genogruppi, che attualmente contano oltre 30 genotipi e numerosi cladi. Finora, i patogeni umani sono stati descritti solo come appartenenti al genogruppo I (GI), con 9 genotipi, al genogruppo II (GII), con 22 genotipi e al genogruppo IV.^{18,19}

I rotavirus appartengono alla famiglia Reoviridae di RNA-virus (dsRNA) senza involucro, di forma icosaedrica, a doppio filamento, e sono classificati in 7 sierogruppi (A - G). Le infezioni umane sono causate solo dai sierogruppi A, B e C, anche se il sierogruppo A dei rotavirus rappresenta oltre il 90 % delle infezioni.¹² I sintomi dell'infezione da rotavirus sono solitamente vomito, diarrea acquosa e dolore addominale. Il virus si trasmette per via oro-fecale attraverso le mani e altri oggetti contaminati. Il rotavirus è la principale causa di diarrea nei bambini di età inferiore ai cinque anni e si stima sia responsabile della morte di 611.000 bambini ogni anno nel mondo.¹³

Clostridium difficile, un batterio anaerobio gram-positivo, formante spore, è stato descritto per la prima volta nel 1935 da Hall e O'Toole come componente della microflora intestinale di neonati sani.¹⁴ Alla fine degli anni '70, tuttavia, il *Clostridium difficile* è stato identificato come causa della diarrea associata alla terapia antibiotica

e della colite pseudomembranosa.¹⁵ Oggi, *Clostridium difficile* è una delle cause più comuni della diarrea nosocomiale. *Clostridium difficile* è responsabile del 15 - 25 % dei casi di diarrea associata alla terapia antibiotica e della quasi totalità dei casi di colite pseudomembranosa.¹⁶ I fattori di rischio che predispongono alla CDAD sono, ad esempio, l'esposizione agli antibiotici, l'età avanzata, il numero e la durata dei ricoveri ospedalieri. Tuttavia, l'infezione da *Clostridium difficile* si riscontra anche in un numero crescente di soggetti non trattati con antibiotici e non ospedalizzati. I sintomi vanno dalla diarrea lieve alle infezioni intestinali di varia gravità, compresa la colite pseudomembranosa, la forma più grave di malattia infiammatoria intestinale indotta da antibiotici. I casi clinici sintomatici sono provocati dai ceppi tossigeni di *Clostridium difficile* che producono la tossina A e la tossina B. Negli ultimi anni, l'incidenza e la gravità delle infezioni da *Clostridium difficile* sono aumentate in tutto il mondo.¹⁷

La RT-PCR real-time permette una rilevazione rapida, estremamente sensibile e specifica della causa infettiva della diarrea. La diagnosi precoce e affidabile della diarrea causata da patogeni consente di somministrare terapie specifiche ai pazienti ospedalizzati e anche di attuare misure igieniche per prevenire la trasmissione nosocomiale.

3. Principio del test

RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel è un test di diagnostica molecolare RT-PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di norovirus (genogruppo I e II), rotavirus e dei geni delle tossine A (tcdA)/B (tcdB) di *Clostridium difficile* in campioni fecali umani.

La rilevazione avviene mediante RT-PCR real-time in una singola fase, durante la quale la PCR segue la trascrizione inversa nella stessa provetta di reazione. L'RNA isolato (norovirus, rotavirus) viene trascritto in cDNA mediante trascrittasi inversa. I frammenti genetici specifici di norovirus (regione della giunzione ORF1/ORF2), rotavirus (NSP3) e della tossina A/B (tcdA/tcdB) di *Clostridium difficile* vengono successivamente amplificati mediante PCR real-time. I target amplificati vengono rilevati 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 rilevatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rilevato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel contiene un **Internal Control RNA** (ICR) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e/o per la determinazione della possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tabella 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	Enzyme Mix	1x	80 µl	rosso
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	marrone
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.
- Scongela 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 e dispositivi aggiuntivi necessari

Il test RIDA® GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time multiplex è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per PCR real-time elencati di seguito:

Tabella 2: Attrezzatura necessaria

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

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

Se si desidera utilizzare piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time diversi, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II e LightCycler® 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 (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 manipolano i campioni o i reagenti.

- 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.

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento del DNA/RNA da campioni fecali umani, utilizzare un kit di estrazione degli acidi nucleici disponibile in commercio (ad es. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione degli acidi nucleici (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre l'acido nucleico virale in base alle istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni fecali con acqua in rapporto 1:3. Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 x g per 30 secondi. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel contiene un Internal Control RNA che rileva l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e conferma che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'Internal Control RNA può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo dell'inibizione della PCR.

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

Se l'Internal Control RNA 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 RNA durante la procedura di estrazione. L'Internal Control

RNA 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 RNA** 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 imprecisioni nel pipettaggio (vedere Tabella 3 e Tabella 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, l'**Enzyme Mix**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l'**Internal Control RNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2 - 8 °C).

Tabella 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICR come controllo di estrazione e 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	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

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

Tabella 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICR 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	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

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 RNA** 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 RNA** alla RT-PCR Mix del controllo negativo.

Campione: dispensare 5 µl di eluato nella Master Mix pre-pipettata.

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

Avvertenze: se l'**Internal Control RNA** 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 RNA** alla RT-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 RT-PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tabella 5, Tabella 6).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo universale RT-PCR real-time

Tabella 5: Profilo universale RT-PCR real-time 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.

Tabella 6: Profilo universale RT-PCR real-time per Mx3005P, ABI7500, 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.

Avvertenze: il profilo per PCR real-time universale può essere utilizzato anche per i test del DNA se i test PCR real-time del DNA RIDA® GENE e dell'RNA RIDA® GENE vengono combinati in un unico ciclo.

9.4 Impostazione del canale di rilevazione

Tabella 7: Selezione dei canali di rilevazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rilevazione	Canale di rilevazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	Tossina A/B di C. difficile	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	Norovirus	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	540/580	
	Rotavirus	540/610	
	Tossina A/B di C. difficile	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Controllare che non vi sia il colorante di riferimento
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Tossina A/B di C. difficile	Cy5	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Tossina A/B di C. difficile	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Tossina A/B di C. difficile	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICR	Giallo	
	Rotavirus	Arancione	
	Tossina A/B di C. difficile	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, occorre che il controllo negativo e il controllo positivo mostrino risultati corretti (vedere Tabella 8, Figura 1, Figura 2, Figura 3).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tabella 8: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA ^{*1}	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

^{*1} 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

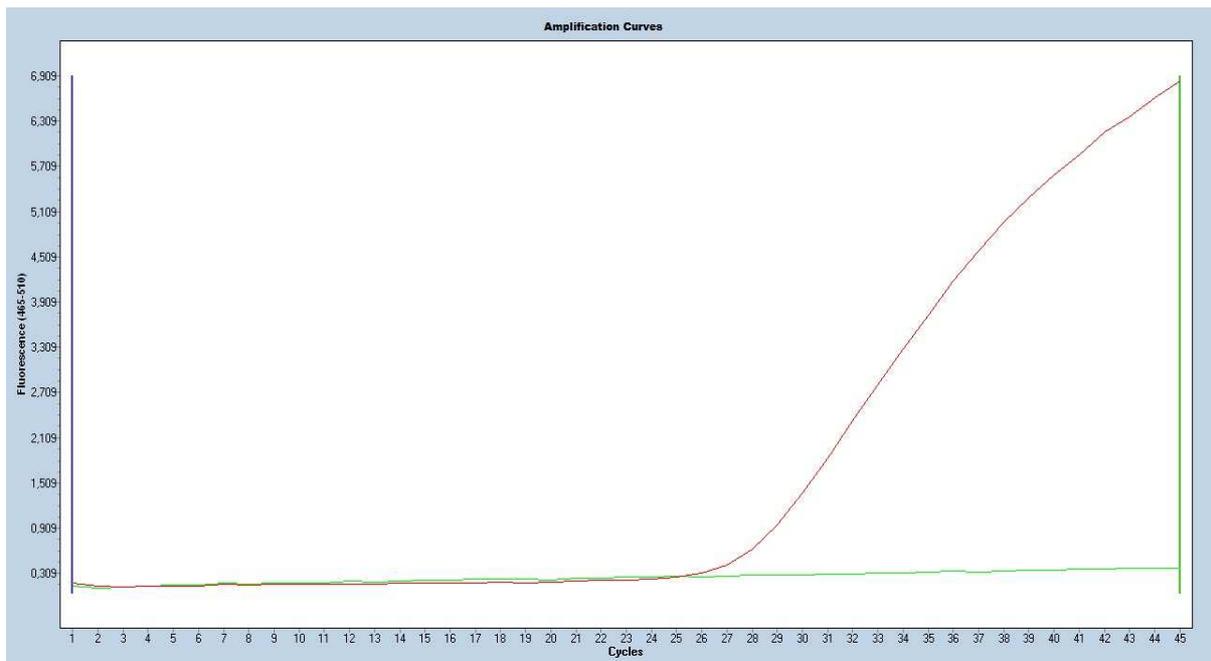


Figura 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (norovirus) sul LightCycler® 480II

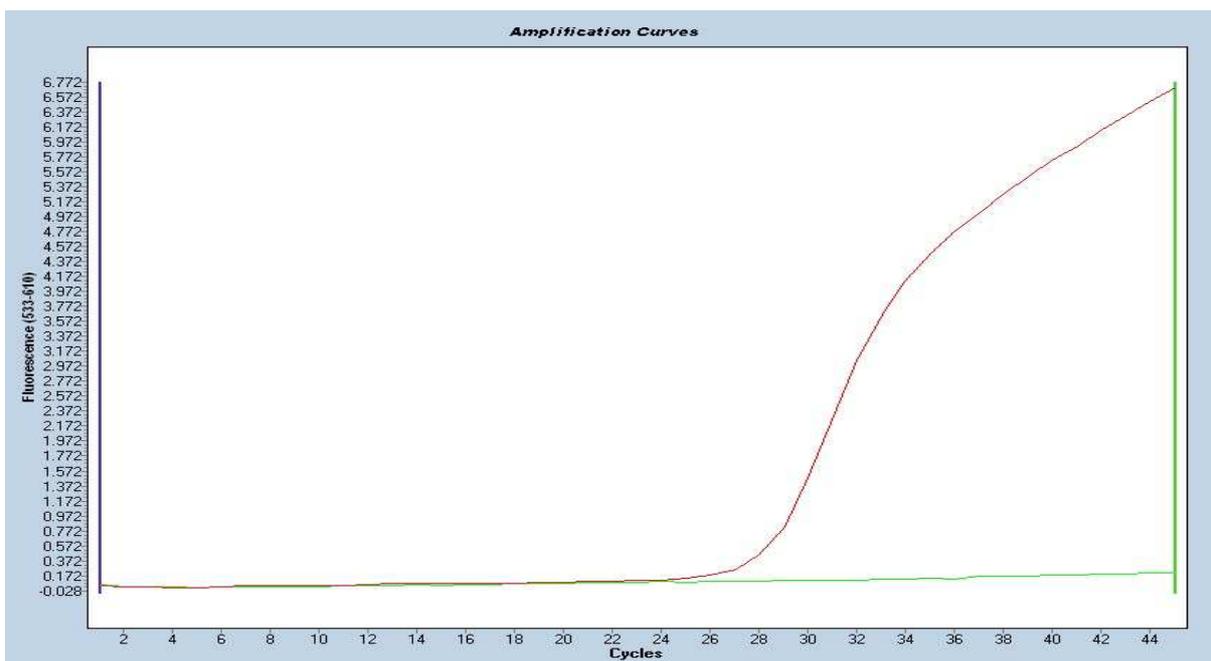


Figura 2: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (rotavirus) sul LightCycler® 480II

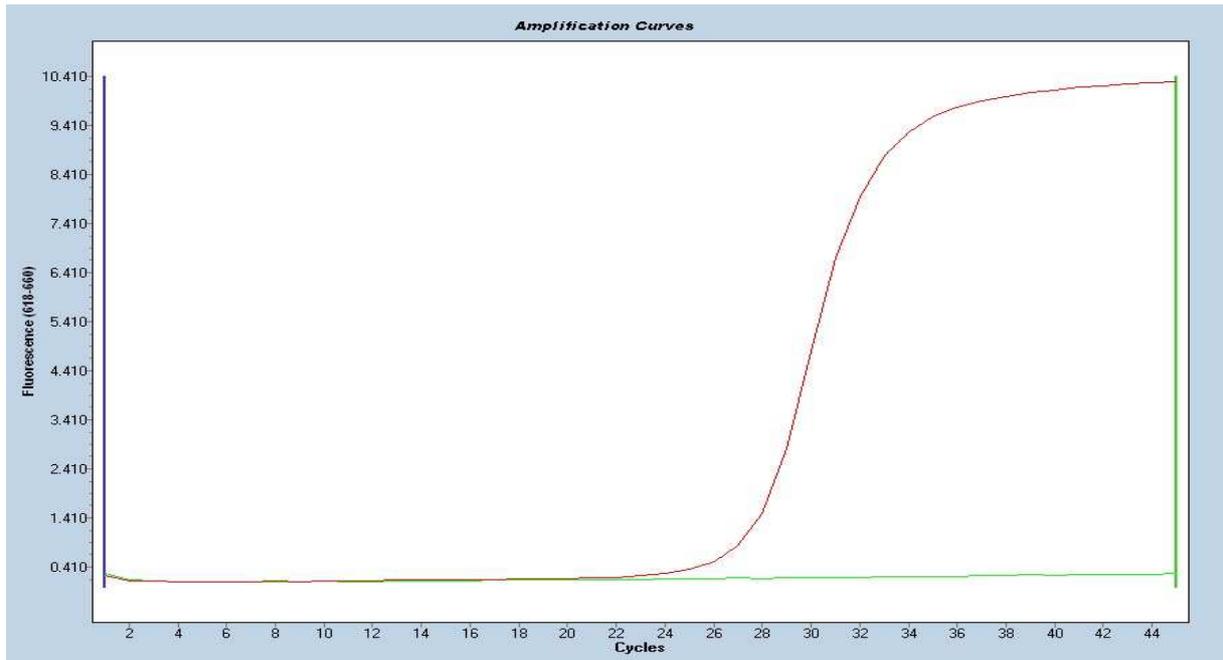


Figura 3: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (geni della tossina A/B di *C. difficile*) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

Tabella 9: Interpretazione del campione

Rilevazione				
Norovirus	Rotavirus	Gene della tossina A/B di <i>C. difficile</i>	ICR/ICD	Risultato
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo/Negativo	Norovirus rilevato
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo/Negativo	Rotavirus rilevato
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo/Negativo	Tossina A/B di <i>C. difficile</i> rilevata
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo/Negativo	Norovirus e rotavirus rilevati
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo/Negativo	Rotavirus e tossina A/B di <i>C. difficile</i> rilevati
Positivo	Negativo	Positivo	Positivo/Negativo	Norovirus e tossina A/B di <i>C. difficile</i> rilevati
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo/Negativo	Norovirus, rotavirus e tossina A/B di <i>C. difficile</i> rilevati
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Geni target non rilevati
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Non valido

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

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

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

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l'**Internal Control** **RNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rilevazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. 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 fecali.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o una carica virale nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre risultati 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 rilevazione di nuovi genotipi di norovirus con il test RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel e causare un falso negativo.
6. Come per tutti i test diagnostici in vitro basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rilevazione (LoD) possono essere rilevati, 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 corrispondenti (norovirus: regione della giunzione ORF1/ORF2, rotavirus: gene NSP3, tossina A/B di *Clostridium difficile*: tcdA/tcdB).
8. Il test RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel può rilevare anche i norovirus del genogruppo IV, che infettano gli esseri umani molto raramente.
9. Il test RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel non può rilevare i rotavirus del sierogruppo B e C.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA[®] GENE Hospital Stool Panel ha un limite di rilevazione ≥ 50 copie per reazione per norovirus, rotavirus e geni della tossina A/B di *Clostridium difficile*.

Le seguenti figure 4, 5 e 6 mostrano le serie di diluizioni di norovirus, rotavirus (ogni $10^5 - 10^1$ copie di RNA per μl) e dei geni della tossina A/B di *Clostridium difficile* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II.

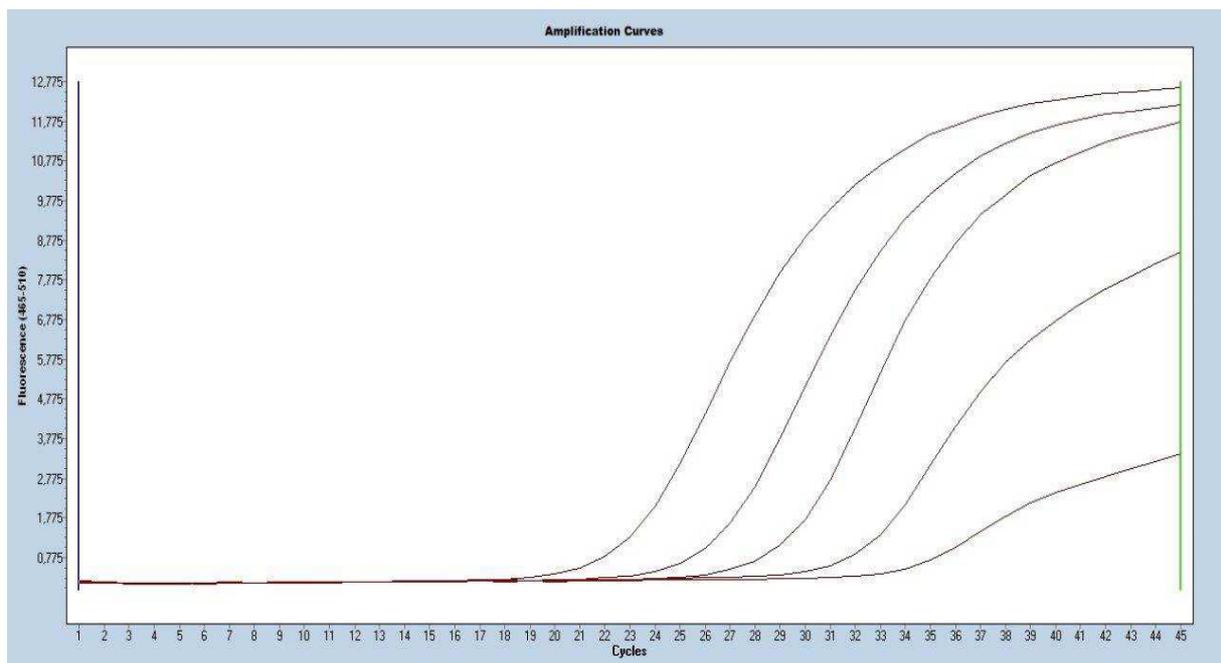


Figura 4: Serie di diluizioni di norovirus ($10^5 - 10^1$ copie di RNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

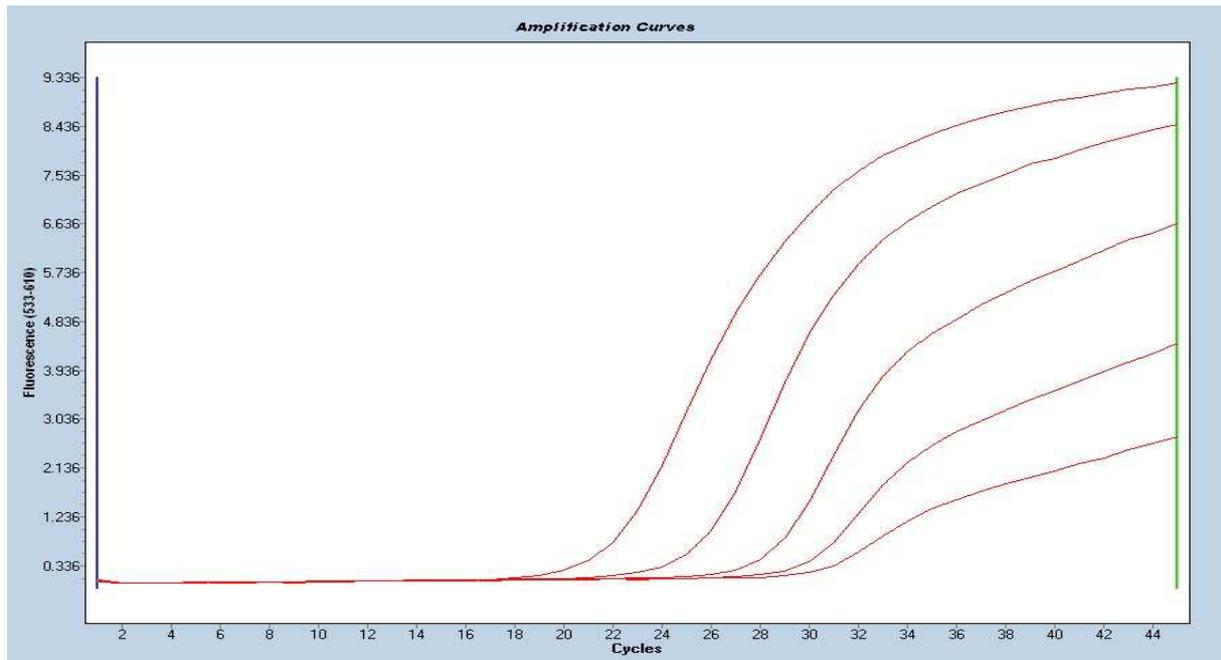


Figura 5: Serie di diluizione di rotavirus ($10^5 - 10^1$ copie di RNA per μl) sul LightCycler® 480II

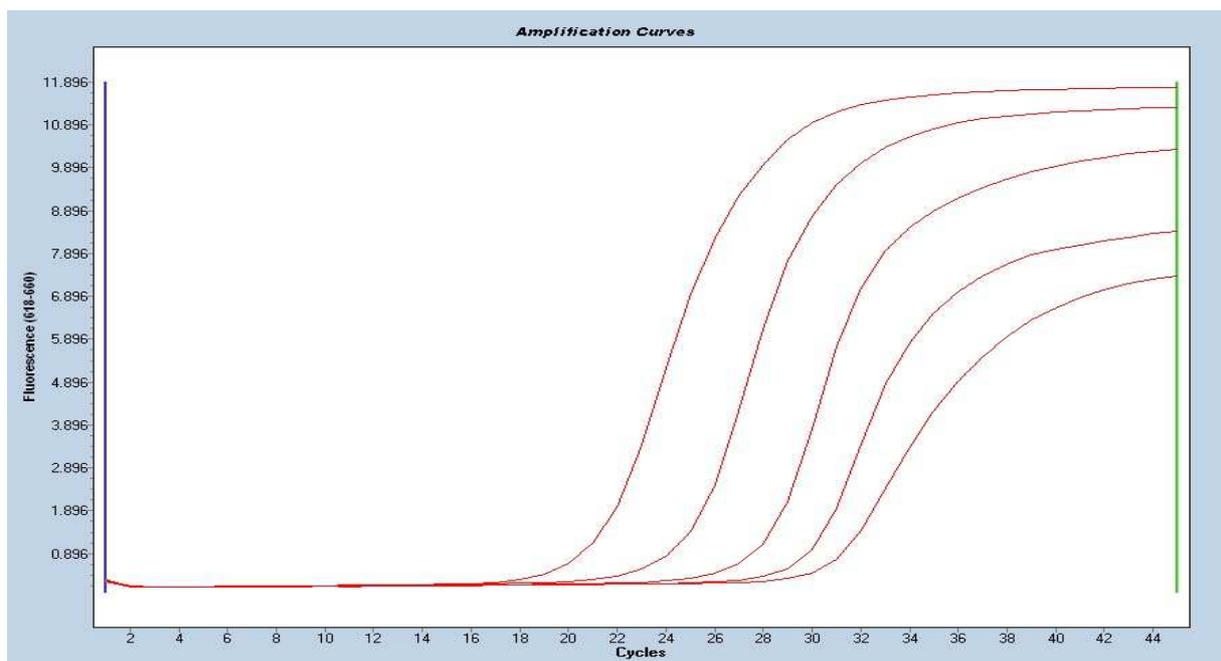


Figura 6: Serie di diluizioni dei geni della tossina A/B di *Clostridium difficile* ($10^5 - 10^1$ copie di RNA per μl) sul LightCycler® 480II.

Il limite di rilevazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione dell'acido nucleico e dalla concentrazione dell'acido nucleico.

13.2 Specificità analitica

Il test RIDA® GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time multiplex è specifico per norovirus (genogruppi I, II e IV), rotavirus (sierogruppo A) e geni della tossina A/B di *Clostridium difficile*. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 10):

Tabella 10: Test di reattività crociata

Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium bifirmentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Reattività analitica

La reattività del test RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time multiplex è stata valutata rispetto a più genotipi dei genogruppi I, II e IV di norovirus e diversi sierotipi delle specie di rotavirus A (vedere Tabella 11). Tutti i genotipi di norovirus e i sierotipi di rotavirus del panel sono stati rilevati da RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time multiplex.

Tabella 11: Test di reattività analitica

Norovirus					
Genogruppo I					
GI.1 – Norwalk	+	GI.3 – Desert Shield, Birmingham	+	GI.6 – Hesse	+
GI.2 – Southampton, Whiterose	+	GI.4 – Chiba, Malta	+	GI.7 – Winchester	+
GI.2 – Southampton, Southampton	+	GI.5 – Musgrove	+	GI.8 – Boxer	+
Genogruppo II					
GII.1 – Hawaii	+	GII.4 – Sydney 2012	+	GII.17 – Kawasaki	+
GII.2 – Melksham	+	GII.6 – Seacroft	+	GII.b – Hilversum	+
GII.3 – Toronto	+	GII.7 – Leeds	+	GII.c – Den Haag	+
GII.4 – Bristol, Grimsby 2004	+	GII.10 – Erfurt	+		
Genogruppo IV					
GIV.1 – Alphanon	+				
Rotavirus					
Sierogruppo A					
Sierotipo G1	+	Sierotipo G2	+	Sierotipo G3	+
Sierotipo G4	+	Sierotipo G9	+	Sierotipo G12	+

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-09-20	Revisione generale 2. Sintesi e spiegazione del test 4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 12. Limiti del metodo 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. Polage CR *et al.* Nosocomial Diarrhea: Evaluation and Treatment of Causes Other Than *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*. 2012.
2. Bartel B *et al.* Nosocomial diarrhea: a review of pathophysiology, etiology, and treatment strategies. *Hosp Pract*. 2012; 40(1):130-138.
3. Weis S *et al.* Nosokomiale Diarrhö. *Internist* 2011; 51:167-178.
4. Pawlowski SW *et al.* Diagnosis and Treatment of Acute or Persistent Diarrhea. *Gastroenterology* 2009 ; 136(6): 1874–1886.
5. Mead PS *et al.* Food- related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:607-625.
6. Glass RJ *et al.* The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S254-261.
7. Evan HS. General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996. *Commun Dis Public Health* 1:165-171.
8. Johnston CP *et al.* Outbreak management and implications of a nosocomial Norovirus outbreak. *CID* 2007; 45:534-540.
9. Corwin AL *et al.* Shipboard impact of a probable Norwalk virus outbreak from coastal Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(6)898-903.
10. Kaplan JE *et al.* An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home: demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* 1982; 116:940-948.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
12. Wilhelmi I *et al.* Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol infect* 2003, 9: 247-262.
13. Parashar UD *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2): 304-306.
14. Hall IC *et al.* Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935, 49: 390–402.
15. Bartlett JG *et al.* Antibiotica-associated pseudomembranous colitis due to a toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 1978; 298:531-543.
16. Bartlett JG *et al.* Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *CID* 2008, 46: S12-18.
17. Bartlett JG. Narrative Review: The new Epidemic of *Clostridium difficile* - Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.
18. Parra GI *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017; 13(1): e1006136.

19.11. Vinjé j. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus.
J. Clin. Microbiol 2015;53(2):373-81