

## RIDA® GENE Bacterial Stool Panel

**REF** PG2405



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germania  
Telefono: +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 Bacterial Stool Panel è un test di PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* in campioni fecali umani.

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel deve essere usato come ausilio nella diagnosi delle infezioni gastrointestinali causate da batteri.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

La diarrea è un problema sanitario grave e causa circa due miliardi di casi in tutto il mondo. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) classifica la diarrea quale seconda causa più frequente di decesso nei bambini di età inferiore ai 5 anni in tutto il mondo, in particolare nei Paesi in via di sviluppo. Ogni anno circa 1,9 milioni di bambini di età inferiore ai 5 anni muoiono di diarrea, più che di AIDS, malaria e morbillo insieme.<sup>1,2</sup> Tra le cause comuni di diarrea batterica vi sono *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., nonché *Y. enterocolitica*.

Le specie di *Campylobacter* sono una delle cause più comuni di diarrea in tutto il mondo e sono responsabili di 400-500 milioni di casi all'anno. La malattia causata dal genere *Campylobacter* è definita campylobatteriosi. Oltre l'80% delle infezioni da *Campylobacter* sono causate da *C. jejuni*. I Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie (Centers for Disease Control and Prevention, abbreviati in CDC) stimano che negli Stati Uniti vi siano oltre due milioni di casi di campylobatteriosi ogni anno. La Rete di sorveglianza attiva delle malattie di origine alimentare (Foodborne Diseases Active Surveillance Network, abbreviato in FoodNet) ha riferito un tasso di incidenza di 13 casi ogni 100.000 individui nel 2008.

La presenza di *C. jejuni* è stata rivelata nel 5-16% dei bambini con diarrea nei paesi sviluppati e nell'8-45% dei bambini con diarrea nei paesi in via di sviluppo.<sup>4</sup> Ogni anno circa 100 persone affette da infezione da *Campylobacter* muoiono negli Stati Uniti.<sup>3,4</sup> L'infezione da *Campylobacter* si contrae attraverso il cibo contaminato, soprattutto pollame, acqua, contatto con animali infetti o per via oro-fecale, in particolare nei bambini. La dose infettiva pari a 500 batteri è relativamente bassa. Dopo un periodo di incubazione di 2-5 giorni, i soggetti con campylobatteriosi accusano febbre, diarrea, crampi addominali, vomito, dolore addominale e nausea. Le potenziali complicazioni a lungo termine sono disturbi autoimmuni, ad esempio la sindrome di Guillain-Barré (GBS).<sup>4</sup>

Anche le specie di *Salmonella* sono una delle principali cause di gastroenterite in tutto il mondo. Il genere *Salmonella* si divide in due specie: *S. enterica* e *S. bongori*. Fino a oggi sono stati descritti oltre 2.500 sierotipi di *Salmonella* patogeni per l'uomo. Le specie di *Salmonella* causano salmonellosi non tifoidea o febbre tifoide. Si stima che ogni anno in tutto il mondo si verifichino 93,8 milioni di casi di infezione da salmonellosi non tifoidea con 155.000 decessi.<sup>6</sup> Secondo le stime del CDC, ogni anno negli Stati Uniti vi sono oltre 1,2 milioni di casi di infezione da salmonellosi

tifoidea, con oltre 23.000 ricoveri ospedalieri e 450 decessi.<sup>5</sup> La maggior parte delle infezioni da salmonellosi non tifoidea è causata da *S. typhimurium* e *S. enteritidis*, mentre la febbre tifoidea è causata da *S. typhi* e *S. paratyphi* A, B or C. La trasmissione della *Salmonella* avviene tramite cibo e acqua contaminati o contatto con animali infetti. La dose infettiva delle specie di *Salmonella* varia da 1 a 1000 batteri. L'infezione da salmonellosi non tifoidea si sviluppa dopo un periodo di incubazione di 6-72 ore e i sintomi clinici sono nausea, vomito, crampi addominali, diarrea, febbre e mal di testa. I soggetti con febbre tifoidea accusano mal di testa, dolorabilità, febbre alta (da 39 °C a 41 °C), sintomi gastrointestinali tra cui dolori addominali e diarrea entro 1-3 settimane dopo l'esposizione all'organismo.<sup>3,7</sup>

*Yersinia enterocolitica* è una delle tre specie di *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) del genere *Yersinia* che sono patogene per l'uomo e causa della malattia gastrointestinale chiamata yersiniosi. Secondo FoodNet, ogni anno negli Stati Uniti si registra un tasso di incidenza di 1 infezione da *Y. enterocolitica* ogni 100.000 persone. Il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie ha segnalato 8.874 casi nel 2007, di cui circa 5.000 provenienti dalla Germania. L'infezione da *Yersinia* si verifica in seguito all'ingestione di cibo o acqua contaminati. La dose infettiva stimata è compresa tra 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> batteri. Dopo un periodo di incubazione da 1 a 11 giorni, i soggetti con yersiniosi soffrono di diarrea, vomito e dolori addominali. *Y. enterocolitica* è stata anche associata con l'artrite reattiva.<sup>3,8</sup> La coltura è il metodo classico per stabilire la diagnosi di laboratorio della diarrea batterica, ma richiede diversi giorni.

### 3. Principio del test

RIDA®GENE Bacterial Stool Panel è un test di PCR multiplex real-time per la rivelazione qualitativa diretta di *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* in campioni fecali umani. Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione dei frammenti genetici specifici per *Salmonella* spp. (*ttr*), *Campylobacter* spp. (16S rDNA) e *Y. enterocolitica* (*ystA/ystB*), se presenti. I target amplificati per *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. ed *Y. enterocolitica* vengono rilevati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante rivelatore 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®GENE Bacterial Stool Panel contiene un Internal Control DNA (ICD) 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	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.
- 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 necessari ma non in dotazione

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

**Tabella 2:** Attrezzatura necessaria

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

**Nota: 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](mailto: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 (acqua di grado bioscientifico, priva di nucleasi)

## 7. Avvertenze e misure precauzionali

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](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Raccolta e conservazione

### 8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento del DNA da campioni di feci umane utilizzare un kit (ad es. RIDA®Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell® RSC (Promega)). Estrarre il DNA 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 giri per 30 s. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il kit per PCR real-time RIDA®GENE Bacterial Stool Panel contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e conferma che l'estrazione dell'acido nucleico è stata 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 Tabella 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.

## 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 Tabella 3, Tabella 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).

**Tabella 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	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.

**Tabella 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	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.

**Nota:** 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 di controllo negativo.

**Campione:** Dispensare 5 µl di DNA Extract alla Master Mix pre-pipettata.

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

**Nota:** 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 di controllo positivo.

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

## 9.3 Impostazione dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

**Tabella 5:** Profilo della PCR real-time per la serie LightCycler® e Rotor-Gene Q e **RIDA®CYCLER**

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

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

**Tabella 6:** Profilo PCR real-time 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

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase

### 9.3.2 Profilo per PCR real-time universale

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

**Tabella 7:** Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler® e RIDA®CYCLER

<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

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

**Tabella 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

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

## 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

**Tabella 9:** Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
<b>R-Biopharm</b> <b>RIDA®CYCLER</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Verde	-
	ICD	Giallo	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Arancione	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Rosso	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation</b> <b>È necessario il kit IV (PG0004)</b>
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
<b>Roche LightCycler® 480 z</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation</b> <b>È necessario il kit IV (PG0004)</b>
	ICD	540/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	540/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	610/670	
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Controllare che non vi sia colorante di riferimento</b>
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>ABI 7500</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno</b>
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Verde	<b>Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite</b>
	ICD	Giallo	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Arancione	
	<i>Campylobacter</i> spp.	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 i controlli positivo e negativo mostrino risultati corretti (vedere Tabella 10, Figura 1, Figura 2, Figura 3).

Il **Positive Control** 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, rispettivamente.

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

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Positive Control	Positivo	NA *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	Non rivelabile

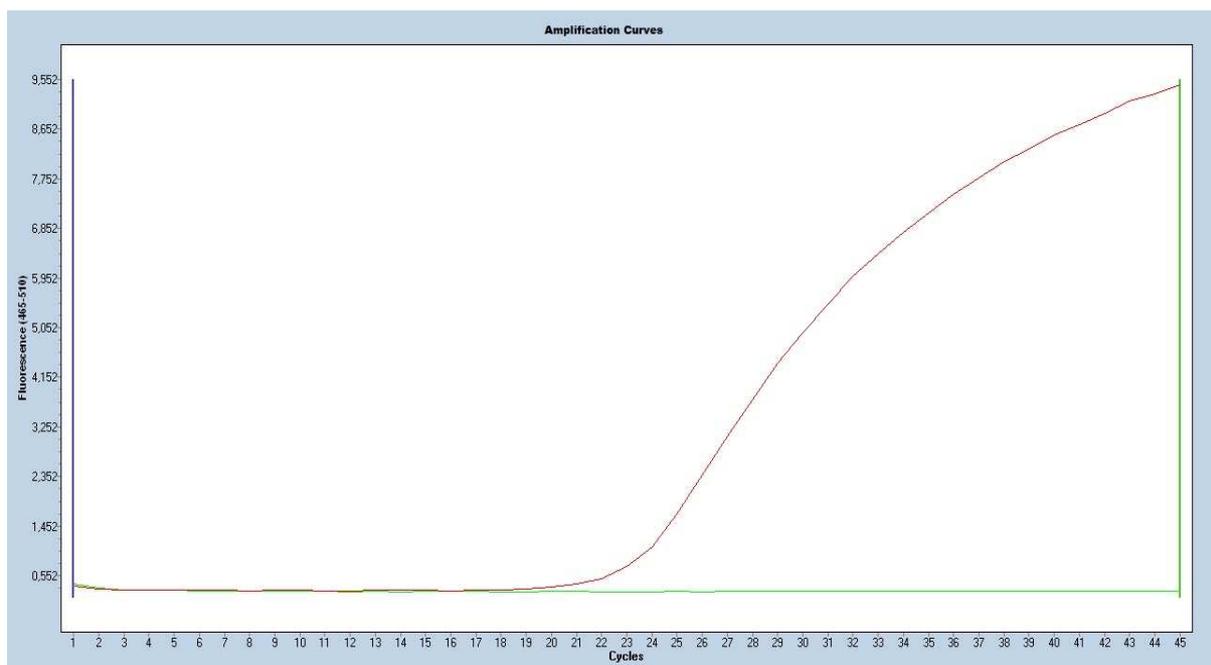
\*1 Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

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.

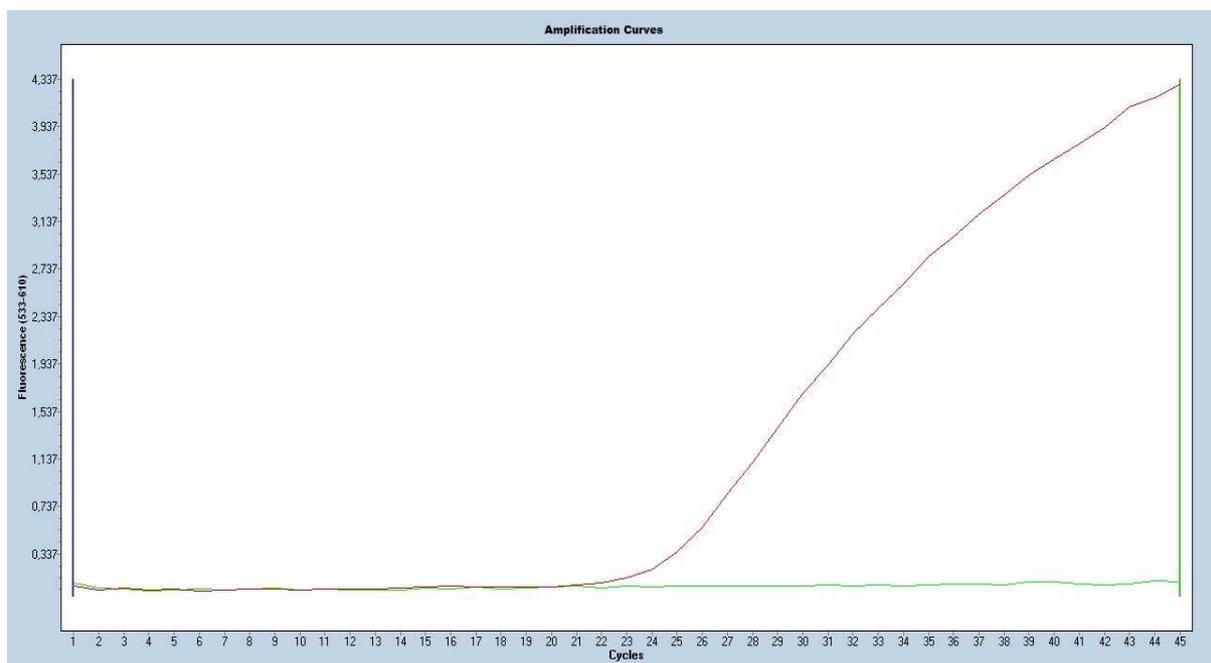
Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

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

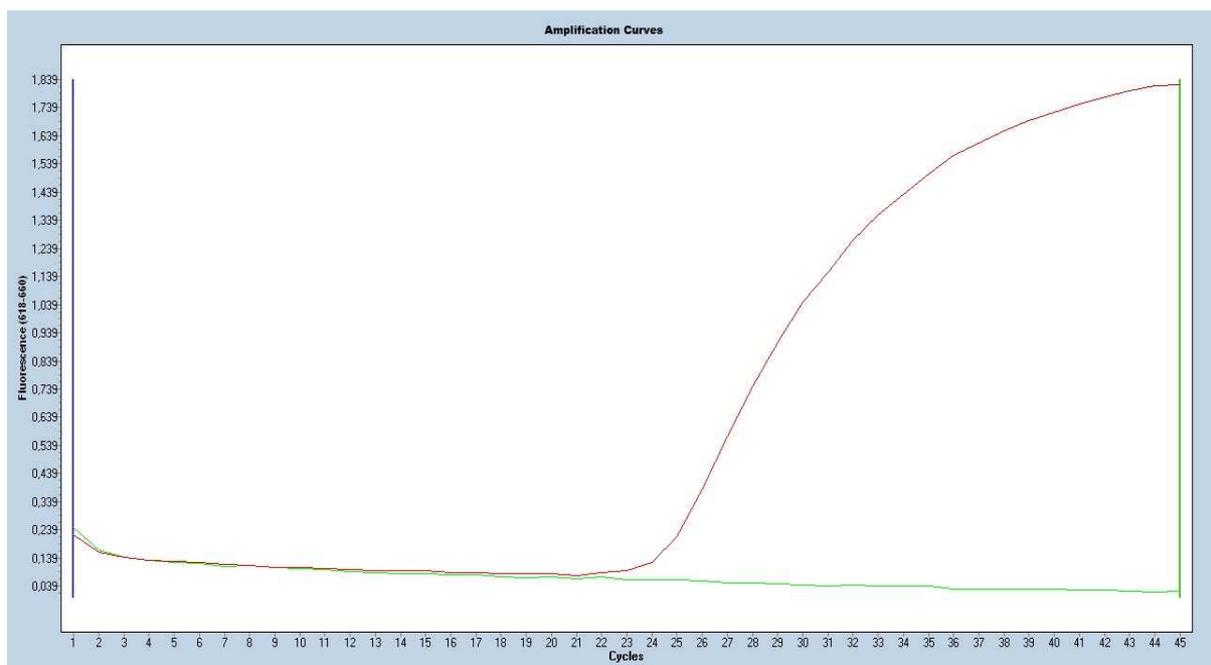
- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



**Figura 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Salmonella* spp.) sul LightCycler® 480II



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



**Figura 3:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Campylobacter* spp.) sul LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tabella 11:** Interpretazione del campione

Geni target			ICD	Risultato
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.		
<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. rivelato</b>
Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	<b><i>Yersinia enterocolitica</i> rivelato</b>
Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	<b><i>Campylobacter</i> spp. rivelato</b>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. e <i>Yersinia enterocolitica</i> rivelati</b>
<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. e <i>Campylobacter</i> spp. rivelati</b>
Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	<b><i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Campylobacter</i> spp. rivelati</b>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	<b><i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Campylobacter</i> spp. rivelati</b>
Negativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Geni target non rivelati</b>
Negativo	Negativo	Negativo	<b>Negativo</b>	<b>Non valido</b>

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

Un campione è valutato come positivo anche se mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione, ma l'**Internal Control DNA** è negativo. La rivelazione dell'**Internal Control DNA** 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 non mostra alcun segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione, ma l'**Internal Control DNA** è positivo. L'inibizione della reazione PCR o un errore nella procedura di estrazione possono essere esclusi dalla rivelazione di **Internal Control DNA**.

Un campione è valutato come non valido se sia il campione sia l'**Internal Control DNA** non mostrano alcun segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione conteneva 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.
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®GENE Bacterial Stool Panel.
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 (*Salmonella* spp. (ttr), *Y. enterocolitica* (**ystA/ystB**), *Campylobacter* spp. (16S rDNA solo *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)).
8. **Mucina, azitromicina e acido stearico/palmitico possono mostrare proprietà di interferenza anche in piccole quantità.**

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Prestazioni cliniche

In uno studio di validazione clinica retrospettiva condotto presso un laboratorio in Olanda abbiamo analizzato 282 campioni fecali con il test RIDA®GENE Bacterial Stool Panel e con un test PCR real-time interno.

**Tab. 12:** Confronto tra i risultati relativi allo *Salmonella* spp. con PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel e con il test di PCR real-time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno			Commenti
		Positivo	Negativo	Totale	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	50	0	50	Concordanza pos.:100 %
	Negativo	0	232	232	Concordanza neg.:100 %
	Totale	50	232	282	

**Tab. 13:** Confronto tra i risultati relativi allo *Yersinia enterocolitica* con PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel e con il test di PCR real-time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno			Commenti
		Positivo	Negativo	Totale	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	33	0	33	Concordanza pos.:77 %
	Negativo	10	239	249	Concordanza neg.:100 %
	Totale	43	239	282	

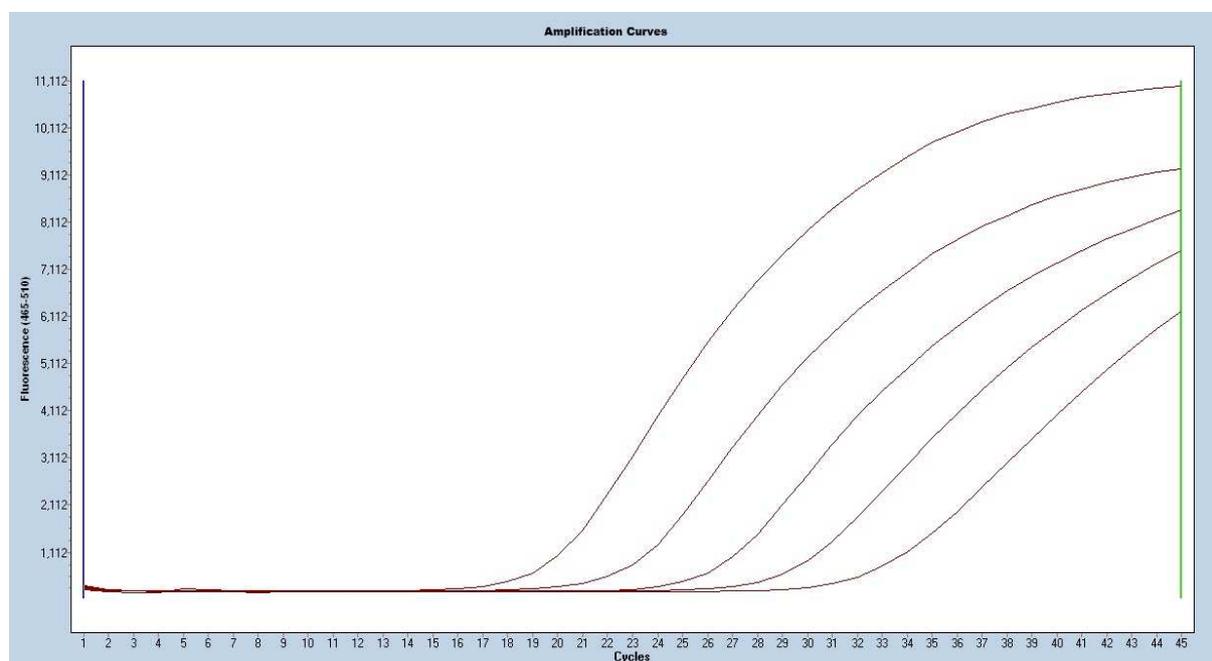
**Tab. 14:** Confronto tra i risultati relativi allo *Campylobacter* spp. con PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel e con il test di PCR real-time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno			Commenti
		Positivo	Negativo	Totale	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	41	1	42	Concordanza pos.:82 %
	Negativo	9	231	240	Concordanza neg.:100 %
	Totale	50	232	282	

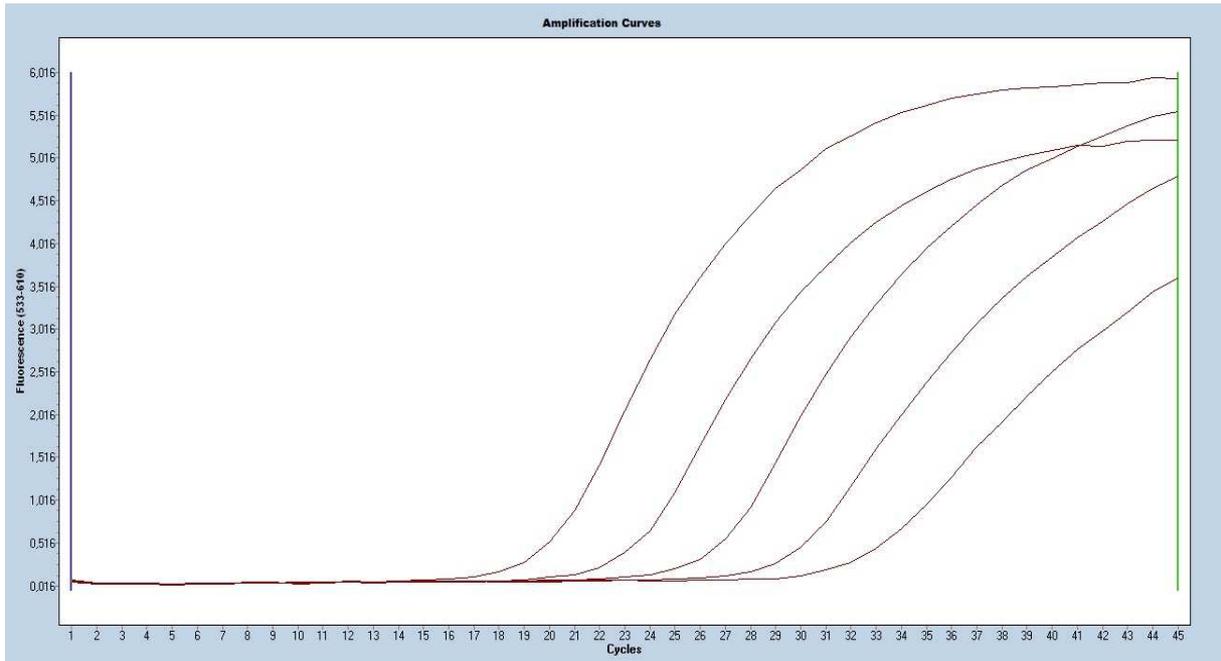
### 13.2 Sensibilità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel ha un limite di rivelazione  $\geq 10$  copie di DNA per reazione per *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*.

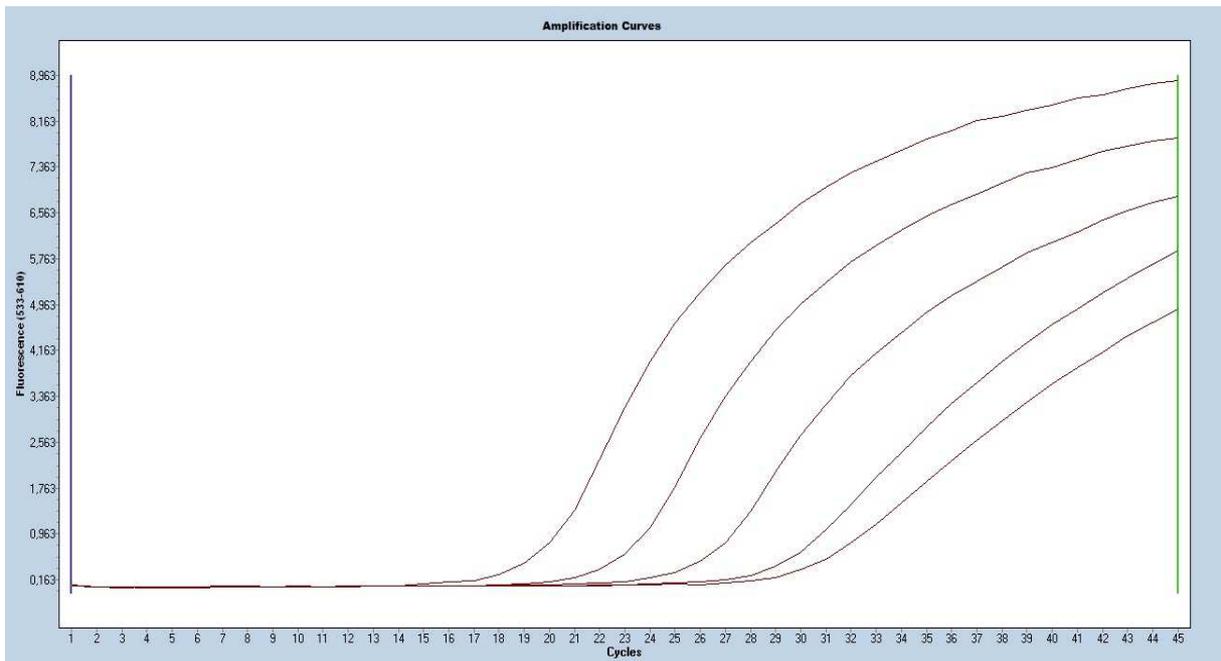
Le figure 4, 5, 6 e 7 seguenti mostrano le serie di diluizioni di *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* (ciascuno  $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II.



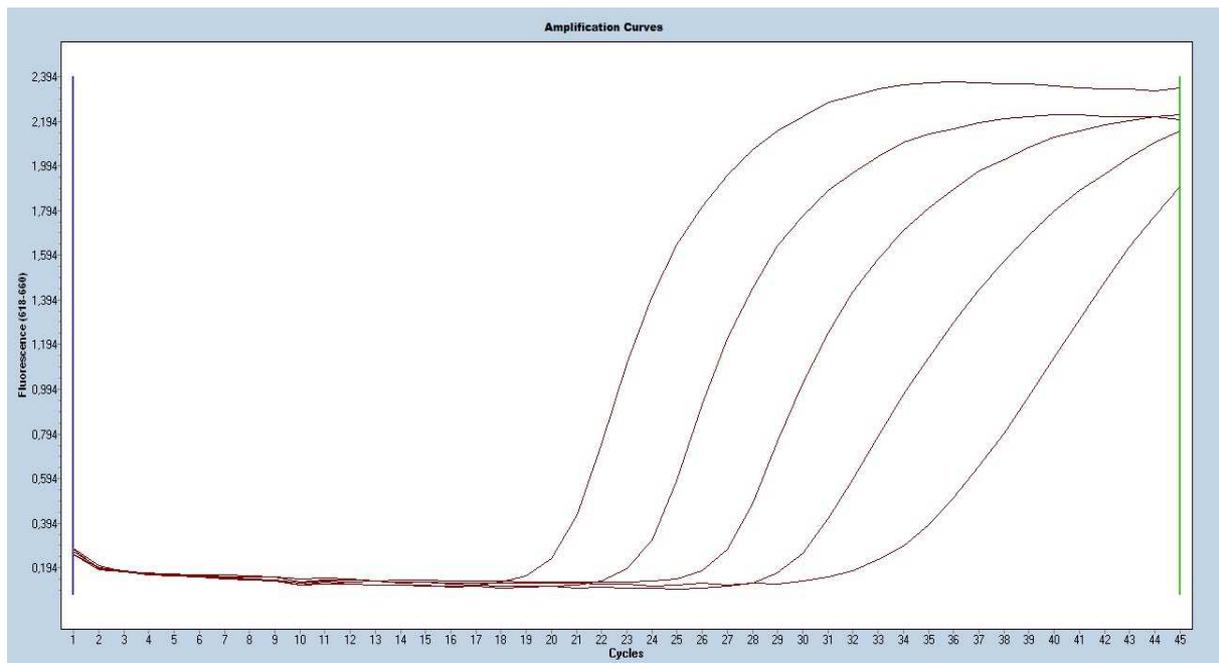
**Figura 4:** Serie di diluizione di *Salmonella* spp. ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II



**Figura 5:** Serie di diluizioni di *Yersinia enterocolitica* (*ystA*) ( $10^5$ -  $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler® 480II



**Figura 6:** Serie di diluizioni di *Yersinia enterocolitica* (*ystB*) ( $10^5$ -  $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler® 480II



**Figura 7:** Serie di diluizione di *Campylobacter* spp. ( $10^5$ –  $10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II

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

### 13.3 Specificità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel è specifico per *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*). Non è stata rivelata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 15):

**Tabella 15:** Test di reattività crociata

<b>Adenovirus 40</b>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<b><i>Yersinia frederiksenii</i></b>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus GG I	-	<b><i>Yersinia kristensenii</i></b>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG II	-	<b><i>Yersinia pseudotuberculosis</i></b>	-
<b><i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i></b>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<b><i>Yersinia rohdei</i></b>	-
<b><i>Campylobacter upsaliensis</i></b>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<b><i>Yersinia ruckeri</i></b>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rotavirus, ceppo Wa	-		

### 13.4 Reattività analitica

La reattività del test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel è stata testata su più sierotipi di *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* spp. (vedere Tabella 16). Tutti i sierotipi di *Salmonella*, le specie di *Campylobacter* e *Yersinia enterocolitica* del panel sono stati rivelati dal test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel.

**Tabella 16:** Test di reattività analitica

<b>Sierotipi di Salmonella</b>					
<i>S. abony</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<i>S. paratyphi B</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<i>S. paratyphi C</i>	+
<i>S. Bareilly</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. choleraesuis</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. typhi</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. newport</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. Dublin</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+		
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. ohio</i>	+		
<b>Specie di Yersinia</b>					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y. enterocolitica</i> sottosp. <i>palearctica</i>	+		
<b>Sottospecie di Campylobacter</b>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. lari</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-06-20	Versione precedente
2020-01-06	Revisione generale 1. Campo di applicazione 3. Principio del test 6. Reagenti necessari ma non in dotazione 9.3 Impostazione dello strumento per PCR 9.4 Impostazione del canale di rivelazione 10. Controllo qualità 12. Limiti del metodo 13. Prestazioni e caratteristiche

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere le istruzioni per l'uso
	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. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrhea in adults and children: a global perspective.
2. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook 2012.
4. Ruiz-Palacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:701–703.
5. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
6. Majowicz SE *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:882–889.
7. Pui CF *et al.* *Salmonella*: A foodborne pathogen. Review Article. *International Food Research Journal* 2011; 18: 465-473.
8. Rosner BM *et al.* Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health* 2010; 10:337.