

## RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I

**REF** PG2415



## 1. Uso previsto

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA®GENE Bacterial Stool Panel I è un test PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di STEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and EIEC/*Shigella* spp. in campioni fecali umani.

Il test RIDA®GENE Bacterial Stool Panel I PCR real-time multiplex 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 rilevata 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 dei 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 o C. Le stime dei CDC indicano oltre 1.800 casi di febbre tifoidea all'anno negli Stati Uniti. La trasmissione della *Salmonella* avviene tramite cibo e acqua contaminati o 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>

Uno dei sei ben noti *E. coli* patogeni per l'uomo è l'*E. coli* enteroinvasivo (EIEC). Nei Paesi in via di sviluppo e nei viaggiatori che tornano da questi Paesi, l'EIEC può causare infezioni simili alla shigellosi per la stretta relazione biochimica e genetica con *Shigella* spp. La patogenicità dell'EIEC e di *Shigella* spp. dipende dalla capacità dipendente dal plasmide di invadere le cellule epiteliali coloniche e distruggerle. L'individuazione del gene ipaH (antigene plasmidico di invasione H) consente di distinguere tra EIEC/*Shigella* spp. ed ETEC.

I sintomi clinici della shigellosi causata da EIEC sono crampi addominali continui con diarrea acquosa e talvolta sanguinolenta. Le fonti di infezione sono principalmente l'acqua e il cibo contaminati, ma è possibile anche la trasmissione uomo-uomo. Oltre a EIEC/*Shigella* spp., anche l'*E. coli* enteroemorragico svolge un ruolo importante. Ogni anno in Germania vengono segnalate circa 1000 infezioni da EHEC. Gli EHEC sono un sottogruppo di *E. coli* produttori della tossina Shiga (STEC o VTEC), con la capacità di produrre due citotossine, la verotossina 1 e 2. Data la stretta somiglianza delle verotossine con le tossine Shiga di *Shigella dysenteriae*, i VTEC sono anche chiamati STEC.

Il metodo diagnostico classico di laboratorio per le infezioni gastrointestinali batteriche è la coltura, che richiede diversi giorni.

Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Bacteria Stool Panel I PCR real-time multiplex è un metodo alternativo funzionale per testare i campioni di feci e ha dimostrato di essere altamente sensibile e specifico per la rilevazione simultanea di quattro dei batteri più importanti che causano diarrea (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. ed EIEC/*Shigella* spp.).

### 3. Principio del test

Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel I è un test PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ed EIEC/*Shigella* spp. Dopo l'isolamento del DNA, ha luogo l'amplificazione dei frammenti di gene specifici per STEC (stx1/stx2), *Salmonella* spp. (ttr), *Campylobacter* spp. (16s-rDNA) ed EIEC/*Shigella* spp. (ipaH), se presenti. 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 reporter e 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 Bacterial Stool Panel I 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

**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.
- Scongela accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2-8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 5 cicli di congelamento/scongelo senza compromettere le prestazioni. (ad esempio dopo il primo scongelamento, separare il reagente in aliquote e congelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2-8 °C).

#### 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

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

**Tab. 2** Attrezzatura necessaria

Piattaforma di estrazione	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC (Promega)
Strumento per la PCR real-time:	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 480II
Agilent Technologies	Mx3005P (con filtro ATTO)

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time, 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
- 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 stanze separate 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 fecali

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

Il kit RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel I PCR real time 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 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 20µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione. L' **Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela del 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 il No Template Control.

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	<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.

**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	<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 del No Template Control.

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

**Controllo positivo:** Dispensare 5 µl di **Positive Control** alla 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 Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

## 9.3 Impostazione dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo della PCR real-time per DNA

**Tab. 5:** Profilo di PCR real time per il LightCycler® 480II

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.

**Tab. 6:** Profilo di PCR real time per Mx3005P

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 della PCR real-time universale

**Nota:** 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 il LightCycler® 480II

<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.

**Tab. 8:** Profilo di PCR real time universale per Mx3005P

<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

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

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Nota
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	STEC	440/488	<b>RIDA® GENE Color Compensation È necessario il kit IV (PG0004)</b>
	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	
	ICD	533/580	
	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	STEC	ATTO	<b>Controllare che non vi sia colorante di riferimento</b>
	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	
	ICD	HEX	
	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	

## 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 positivo e il controllo negativo mostrino risultati corretti (vedere Tabella 10, Fig. 1, Fig. 2, Fig.3, Fig. 4).

Il **Positive Control** per STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. e *Campylobacter* spp. 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.

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

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

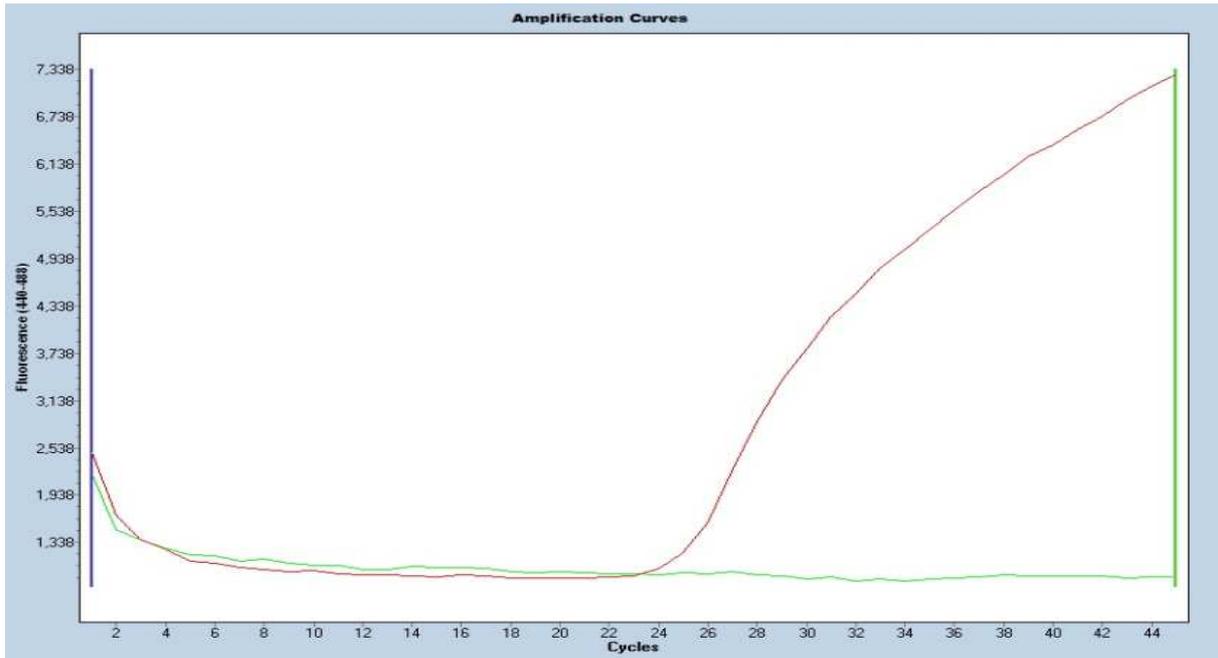
<sup>\*1</sup> Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

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.

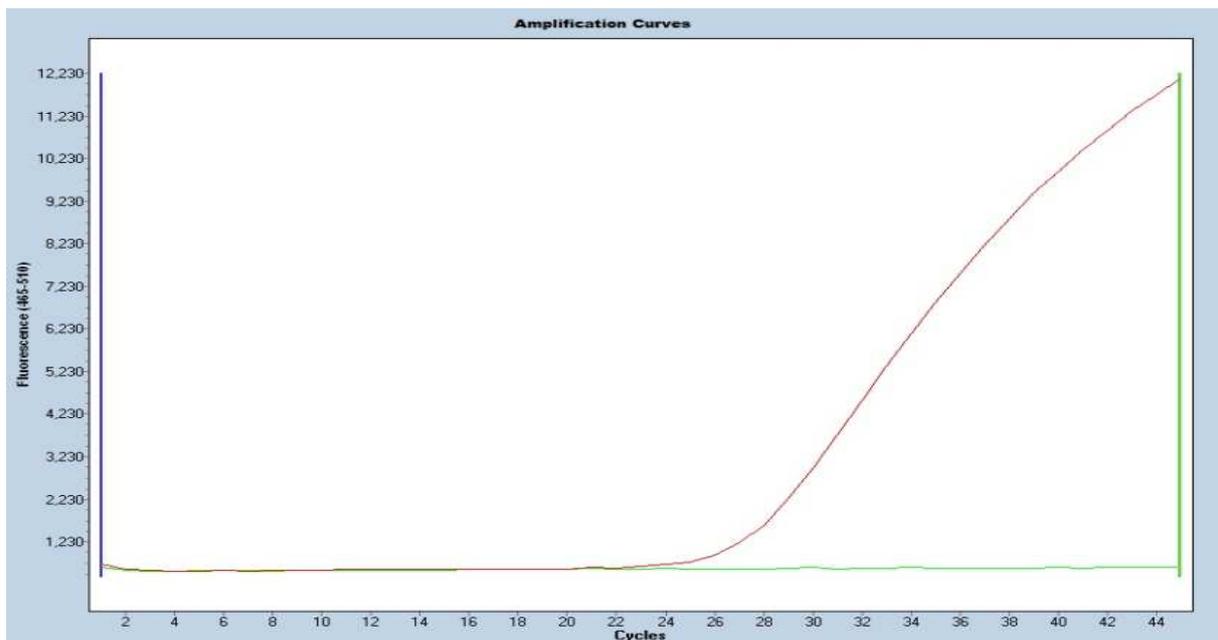
Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

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

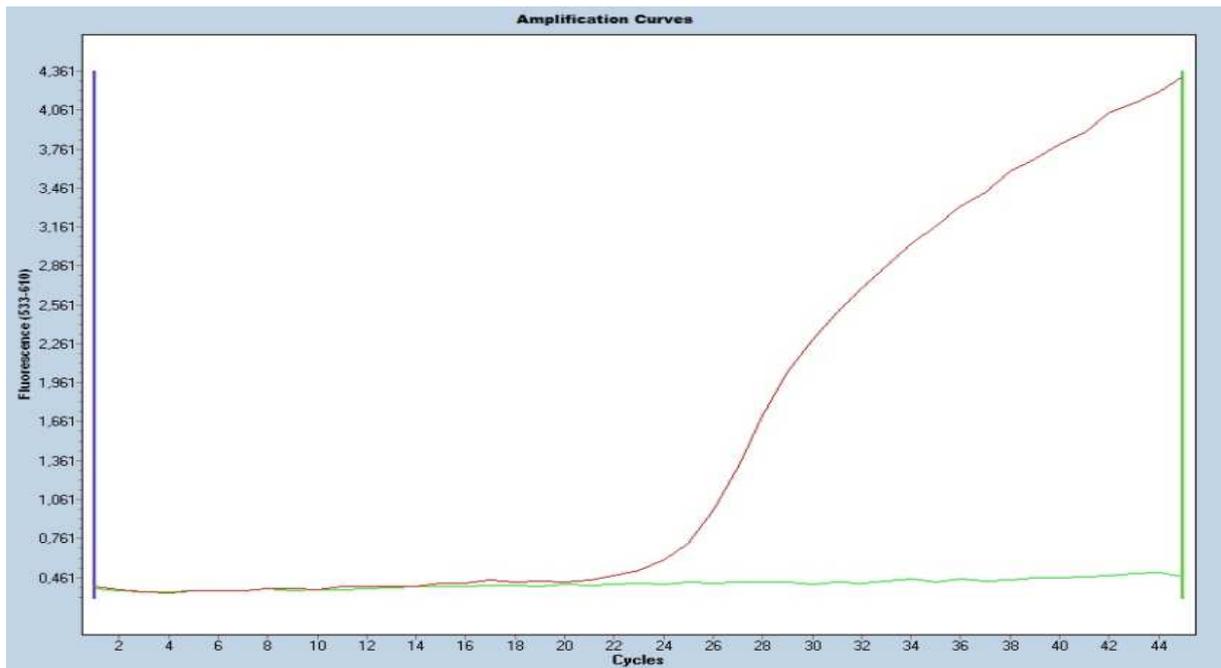
- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



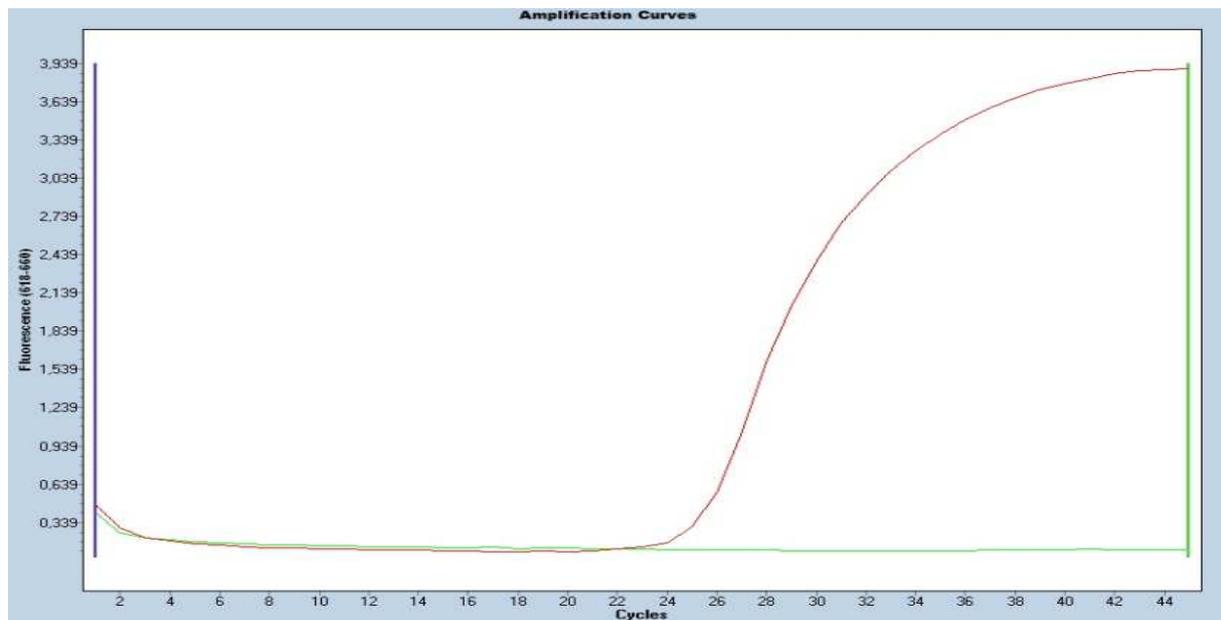
**Fig.1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e del No template control (STEC) sul LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Esecuzione corretta del controllo positivo e del No template control (*Salmonella* spp.) sul LightCycler® 480II



**Fig. 3:** Esecuzione corretta del controllo positivo e del No template control (EIEC/*Shigella* spp) sul LightCycler® 480II



**Fig. 4:** Esecuzione corretta del controllo positivo e del No template control (*Campylobacter* spp.) sul LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tab. 11:** Interpretazione del campione

Geni target					
STEC	<i>Salmonella</i> spp.	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.	ICD	Risultato
positivo	negativo	negativo	negativo	positivo/negativo	STEC rivelato
negativo	positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp. rivelata
negativo	negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelata
negativo	negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Campylobacter</i> spp. rivelata
positivo	positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	STEC, <i>Salmonella</i> spp. rivelati
positivo	negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	STEC, EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelati
positivo	negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	STEC, <i>Campylobacter</i> spp. rivelati
positivo	positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	STEC, <i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelati
positivo	negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	STEC, EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. rivelati
positivo	positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	STEC, <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. rivelati
negativo	positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp. rivelati
negativo	positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. rivelati
negativo	positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. rivelati
negativo	negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. rivelati
positivo	positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	STEC, <i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. rivelati
negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Non valido

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 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 se mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione, ma l' **Internal Control DNA** è negativo. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono causare un segnale debole o assente del controllo di amplificazione interno.

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

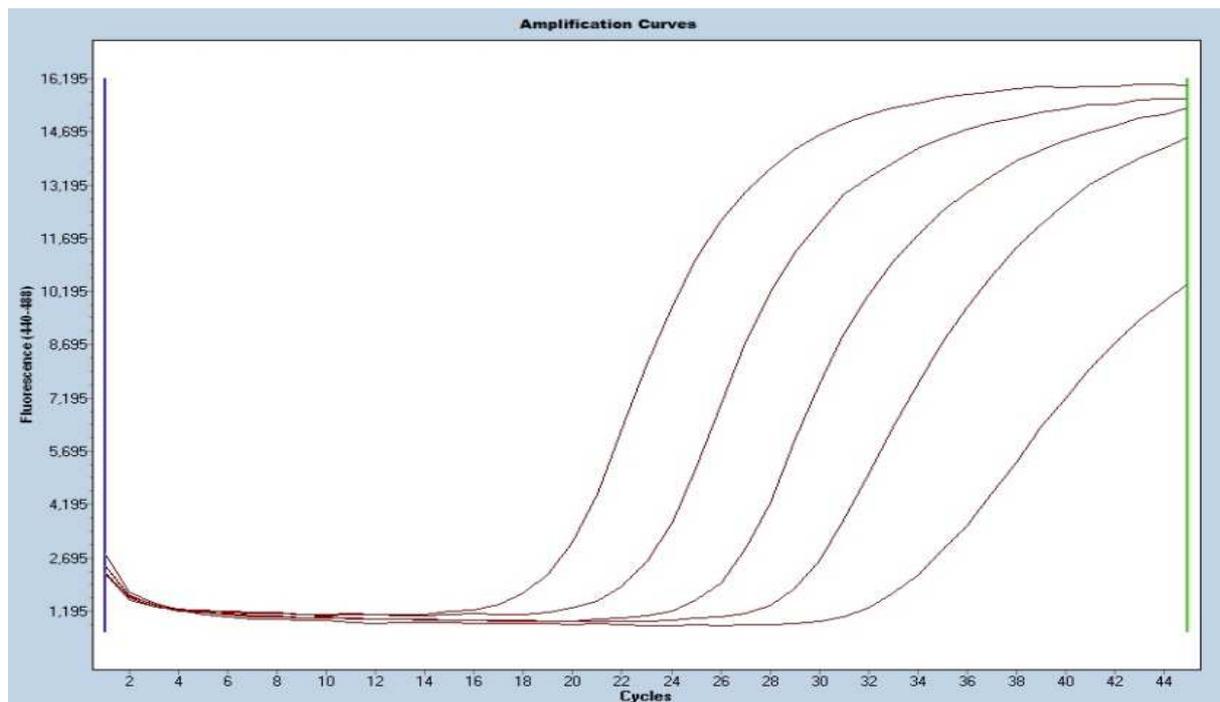
1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei 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<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel I.
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 corrispondenti (stx1/2, ttr, 16s-rDNA, ipaH).

## 13. Prestazioni e caratteristiche

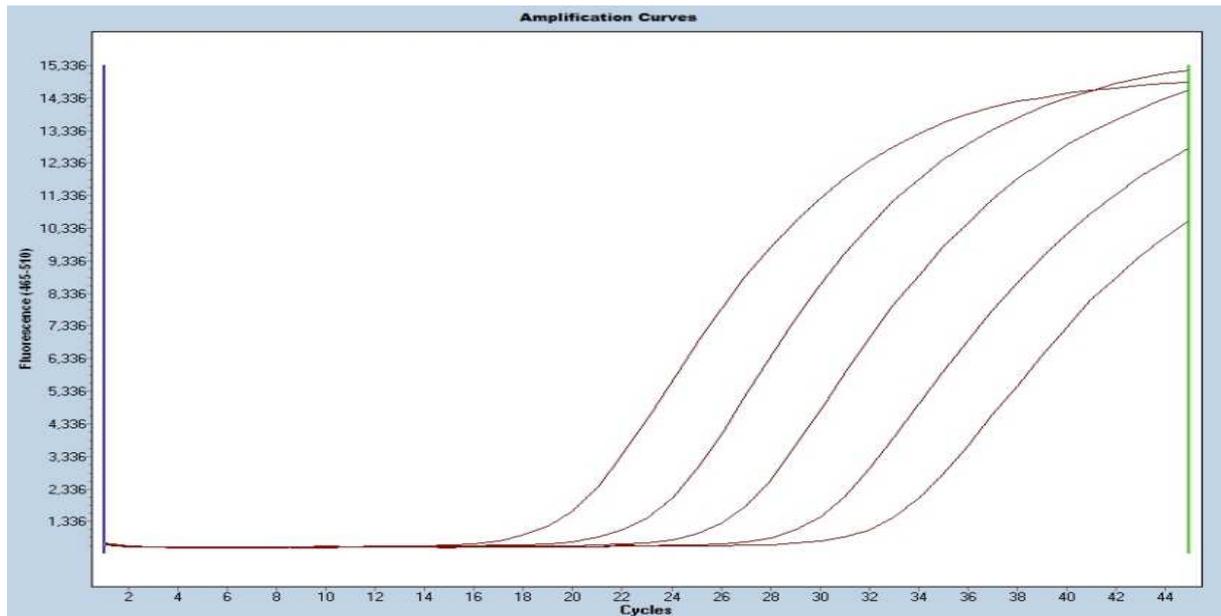
### 13.1 Sensibilità analitica

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

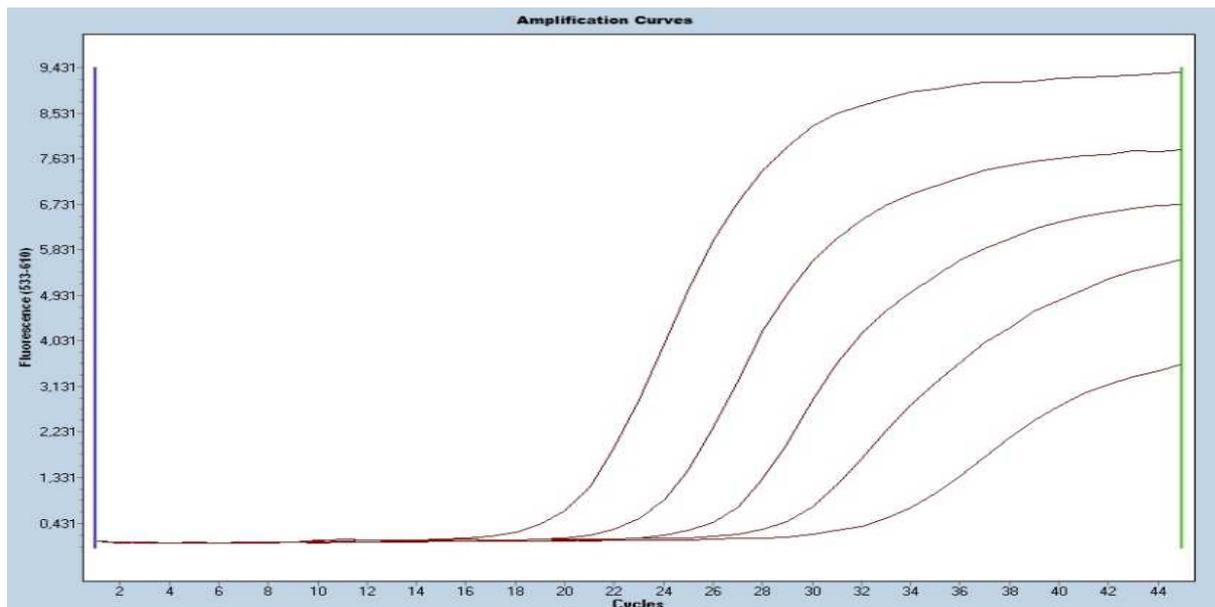
Le figure 5, 6, 7 e 8 seguenti mostrano le serie di diluizioni di STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. e *Campylobacter* spp. ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II.



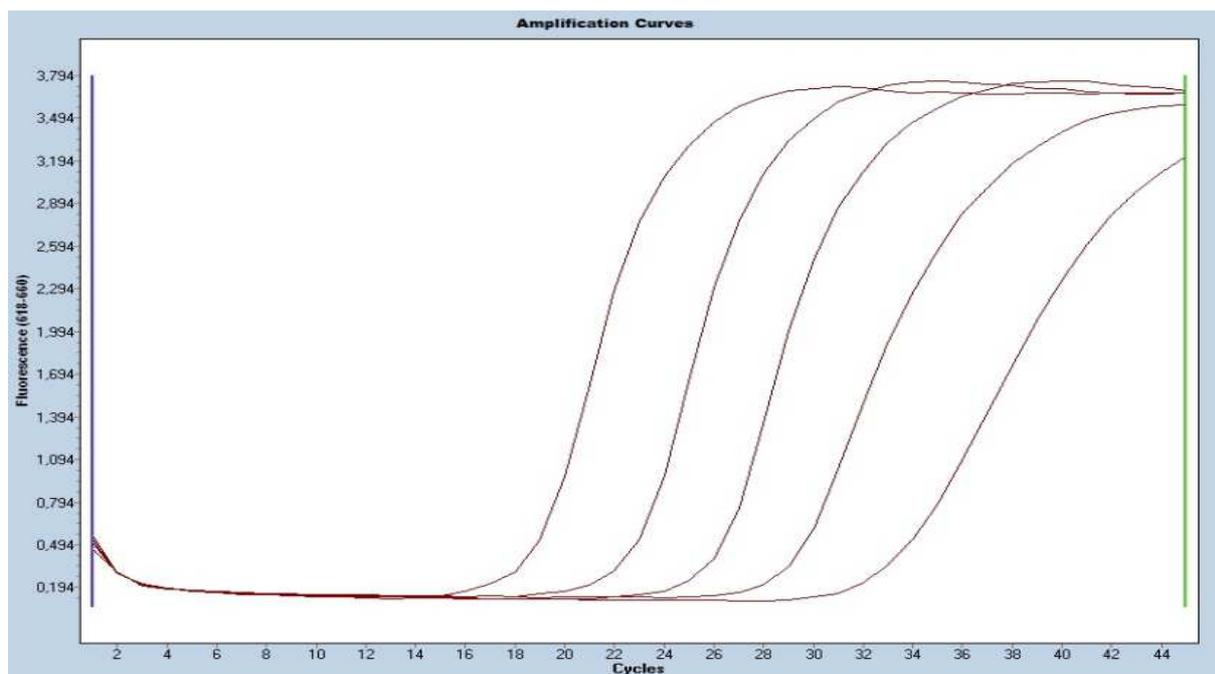
**Fig. 5:** Serie di diluizione di STEC ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II



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



**Fig.7:** Serie di diluizione di *EIEC/Shigella* spp. ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler® 480II



**Fig. 8:** Serie di diluizione di *Campylobacter* spp. ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu$ 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.

## 13.2 Specificità analitica

Il test RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I PCR real-time multiplex è specifico per STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. e *Campylobacter* spp. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 12):

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

Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG I	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG II	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Clostridium bifirmentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-						

### **13.3 Reattività analitica**

La reattività del test RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I PCR real-time multiplex è stata valutata rispetto a più sottotipi stx1/stx2, *Campylobacter* spp., sierotipi di *Salmonella* e EIEC/*Shigella* spp. (vedere Tab. 13). Tutti i genogruppi STEC, le *Campylobacter* spp., i sierotipi di *Salmonella* e le EIEC/*Shigella* spp. del panel sono stati rivelati dal test RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I PCR real-time multiplex.

**Tab. 13:** Test di reattività crociata

Sottotipi stx1					
stx1a	+	stx1c	+	stx1d	+
Sottotipi stx2					
stx2a	+	stx2d	+	stx2g	+
stx2b	+	stx2e	+		
stx2c	+	stx2f	+		
Specie di <i>Campylobacter</i>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+	<i>C. lari</i>	+
Sierotipi di <i>Salmonella</i>					
<i>S. augustenbourg</i>	+	<i>S. ealing</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+
<b><i>S. abony</i></b>	+	<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. newport</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. essen</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+
<i>S. amsterdam</i>	+	<i>S. glostrup</i>	+	<i>S. ohio</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. gloucester</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. goldcoast</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<b><i>S. bareilly</i></b>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. poona</i>	+
<i>S. berta</i>	+	<i>S. haifa</i>	+	<i>S. pullorum</i>	+
<i>S. blegdam</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. rostock</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<b><i>S. saintpaul</i></b>	+
<i>S. bovismorbificans</i>	+	<b><i>S. javiana</i></b>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. brandenburg</i>	+	<b><i>S. kedougou</i></b>	+	<i>S. senftenberg</i>	+
<i>S. caracas</i>	+	<i>S. kentucky</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<b><i>S. chloeraesius</i></b>	+	<i>S. kiel</i>	+	<i>S. virchow</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. livingston</i>	+	<i>S. wernigerode</i>	+
<b><i>S. diarizonae</i></b>	+	<b><i>S. mississippi</i></b>	+	<i>S. wilhelmsburg</i>	+
<i>S. dublin</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<b><i>S. worthington</i></b>	+
<i>S. duesseldorf</i>	+	<i>S. moscow</i>	+		
<i>Shigella</i>					
<i>S. boydii</i>	+	<i>S. dysenteriae</i>	+	<i>S. flexneri</i>	+
<i>S. sonnei</i>	+				

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2015-06-15	Versione di rilascio
2018-06-06	Revisione generale
2018-06-06	4. Contenuto della confezione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione simboli

## 15. Descrizione 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 testo

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 2012. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook.
4. Ruiz-Palacios GM. 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. Clinical Infectious Diseases 2010; 50:882–889.
7. Pui CF et al. International Food Research Journal 2011; 18: 465-473.