

RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II

REF PG1725



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II è un test PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* in campioni fecali umani.

Il test RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II PCR real-time multiplex deve essere usato come ausilio nella diagnosi delle infezioni gastrointestinali causate da parassiti.

2. Sintesi e spiegazione del test

Giardia lamblia, *Cryptosporidium* ed *Entamoeba histolytica* sono i protozoi più importanti che causano diarrea.

Giardia lamblia (sinonimo di *G. intestinalis* o *G. duodenales*) è una delle cause più importanti di diarrea. Secondo il CDC (Center for Disease Control) circa il 2 % di tutti gli adulti e il 6 - 8 % di tutti i bambini nei paesi sviluppati e circa un terzo di tutte le persone nei paesi in via di sviluppo sono contraggono l'infezione da giardiasi.¹ Il CDC stima circa 77.000 casi di giardiasi ogni anno negli Stati Uniti.² L'infezione da *G. lamblia* avviene per ingestione di cisti in cibo o acqua potabile contaminati, o per via oro-fecale da persona a persona. Il periodo di incubazione è di 1-3 settimane. I sintomi della giardiasi (lambliasi) sono la diarrea acuta o cronica, ma si può anche avere una forma asintomatica con eliminazione delle cisti. I sintomi acuti includono diarrea acquosa, perdita di appetito, nausea, crampi addominali e perdita di peso.¹ *Cryptosporidium parvum* è una delle numerose specie del genere *Cryptosporidium*. Oltre a *C. parvum*, anche *C. hominis* causa comunemente criptosporidiosi nell'uomo.⁶ Tuttavia, anche le infezioni causate da altri *Cryptosporidium* spp. come *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, e *C. muris* possono causare sintomi clinici.³ La Criptosporidiosi è stata rilevata nello 0,2 % dei soggetti sani e circa nel 2 % dei pazienti con diarrea nei paesi sviluppati. Nei paesi in via di sviluppo la prevalenza è aumentata fino al 9 %. Nei pazienti con HIV e diarrea, è stato rilevato *Cryptosporidium* spp. fino al 14-24 % mentre fino al 5 % dei pazienti asintomatici con HIV erano infetti.^{4,5} Durante un'epidemia a Milwaukee (Stati Uniti) nel 1993, oltre 400.000 persone erano ammalate.⁶ Ogni anno si stima che negli Stati Uniti si verificano 748.000 casi di criptosporidiosi.⁷ L'infezione si verifica dopo l'ingestione di oocisti in acqua e cibo contaminati, come pure per via oro-fecale da persona a persona. Nelle persone immunocompetenti, la malattia si manifesta dopo 2-10 giorni come diarrea acquosa autolimitante e può essere accompagnata da nausea, dolore addominale e perdita di peso. Isoggetti immunocompromessi spesso sviluppano malattie gravi, croniche e talvolta fatali.^{2,6}

Entamoeba histolytica è l'unica specie patogena per l'uomo del genere *Entamoeba* ed è l'agente eziologico dell'amebiasi. L'infezione da *E. histolytica* avviene per ingestione di cisti in cibo e acqua potabile contaminati o per via oro-fecale da persona a persona. La maggior parte delle infezioni da *E. histolytica* si manifesta come una colonizzazione asintomatica. Nel 10 % dei casi, l'infezione provoca colite amebica e, in rare occasioni, amebiasi extraintestinale, principalmente del fegato

(accesso epatico amebico). I sintomi clinici associati all'amebiasi intestinale consistono in dolore gastrico e diarrea grave con feci sanguinolente e vischiose. L'OMS stima che circa 50 milioni di persone in tutto il mondo soffrono di amebiasi ogni anno, provocando 100.000 morti all'anno.^{2,8}

Tipicamente, la diagnosi di infezione da *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba* spp. avviene mediante l'esame microscopico di campioni fecali, a opera di personale esperto. Il test RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II PCR real-time multiplex è un metodo alternativo nuovo e funzionale per testare i campioni di feci e ha dimostrato di essere altamente sensibile e specifico per la rilevazione simultanea dei tre parassiti più importanti che causano diarrea (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica*).

3. Principio del test

RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II è un test PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* in campioni fecali umani.

Dopo l'isolamento del DNA viene eseguita l'amplificazione dei frammenti genetici (ITS1-18S, se presenti) specifici per *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica*.

I target amplificati per *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* 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 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 Parasitic Stool Panel II 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	2	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1	450 µl	bianco
P	Positive Control	1	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.
- Scongellare i reagenti con cura e completamente prima dell'uso (es. in un frigorifero a 2-8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 5 cicli di congelamento/scongellamento 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 al freddo in modo appropriato (2-8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test RIDA[®] GENE Parasitic Stool Panel II 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 [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Strumento 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

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

Se per la PCR real-time si preferisce utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti, 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 (grado bioscientifico, priva di nucleasi, trattata con DEPC)

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.

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[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione di DNA (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore.

Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni di feci con acqua in rapporto 1:3. Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 x g per 30 s. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA[®] GENE Parasitic stool panel II contiene un **Internal Control DNA** che rileva l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia stata sufficiente.

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

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

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

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

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

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

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

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

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

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

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 controllo negativo.

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 del controllo positivo.

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

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo della PCR real-time per DNA

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

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

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

Tab. 6: Profilo della PCR real-time del DNA per Mx3005P, ABI7500 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 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 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

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

Tab. 8: Profilo PCR real-time universale 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

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

9.4 Impostazione del canale di rilevazione

Tab. 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rilevazione	Canale di rilevazione	Nota
Roche LightCycler® 480II	<i>Giardia lamblia</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessario
	ICD	533/580	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	533/610	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Giardia lamblia</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessario
	ICD	540/580	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	540/610	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	610/670	
ABI 7500	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	Controllare che non vi sia il colorante di riferimento
	ICD	HEX	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Giardia lamblia</i>	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICD	Giallo	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Arancione	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Rosso	
Bio-Rad CFX96™	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	
	<i>Cryptosporidium</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).

Il **Positive Control** per *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* 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, rispettivamente.

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

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA * 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'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

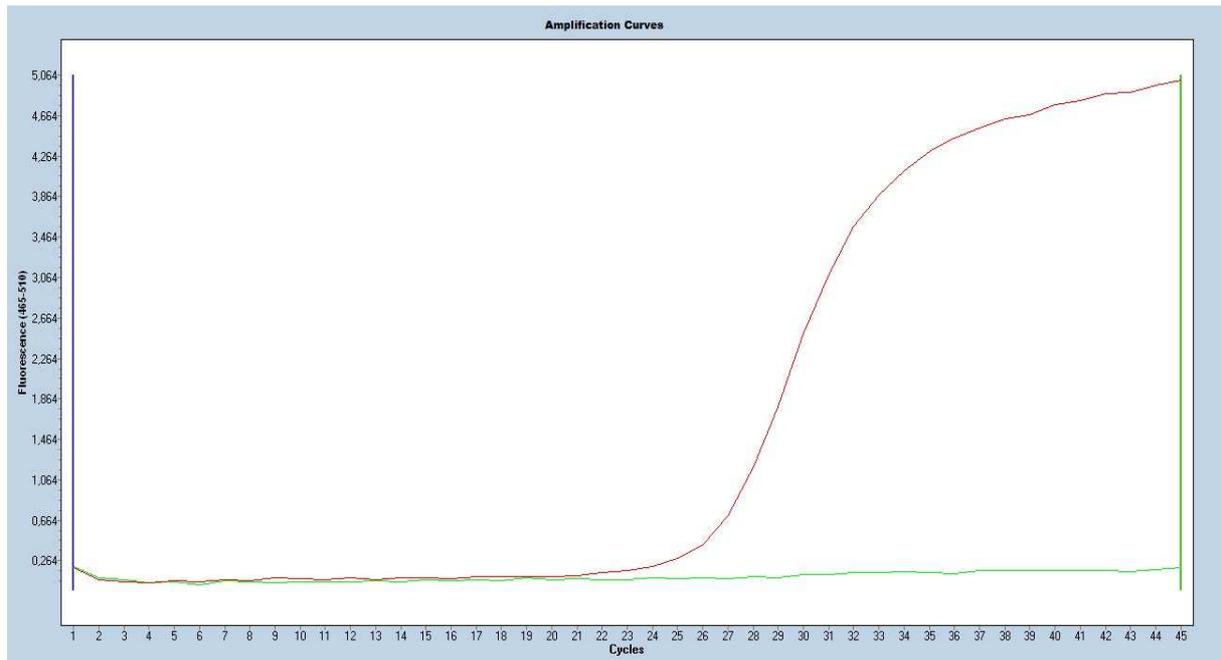


Fig. 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e del controllo negativo (*Giardia lamblia*) sul LightCycler® 480II

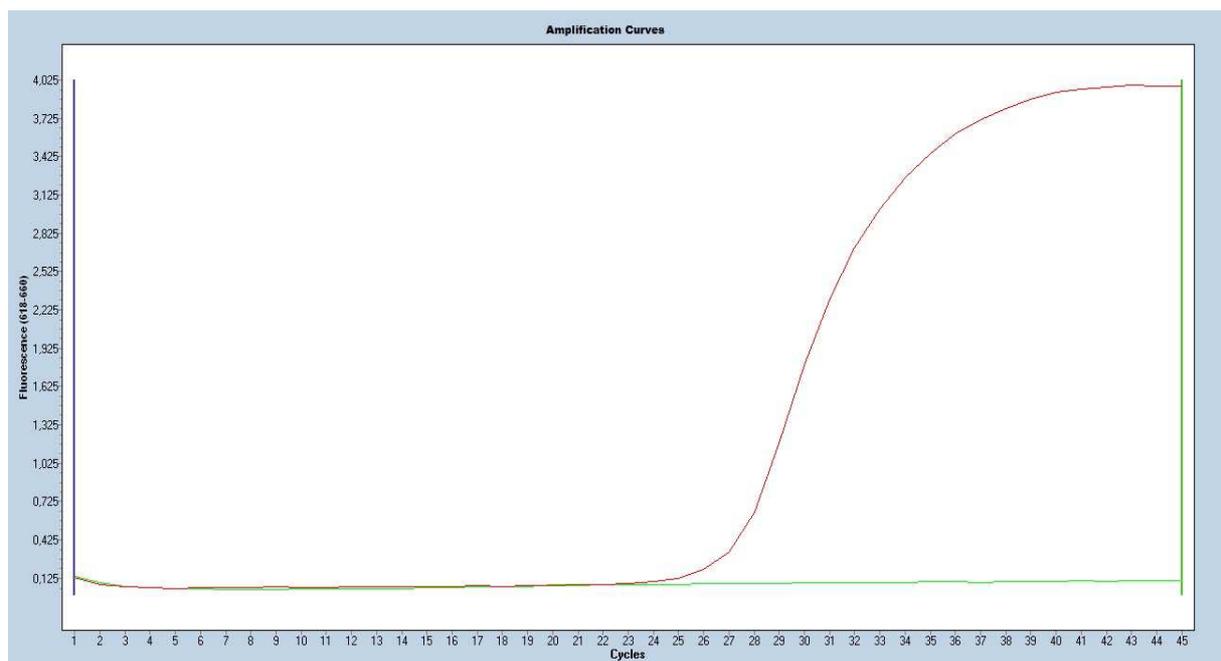


Fig. 2: Esecuzione corretta del controllo positivo e del controllo negativo (*Cryptosporidium* spp.) sul LightCycler® 480II

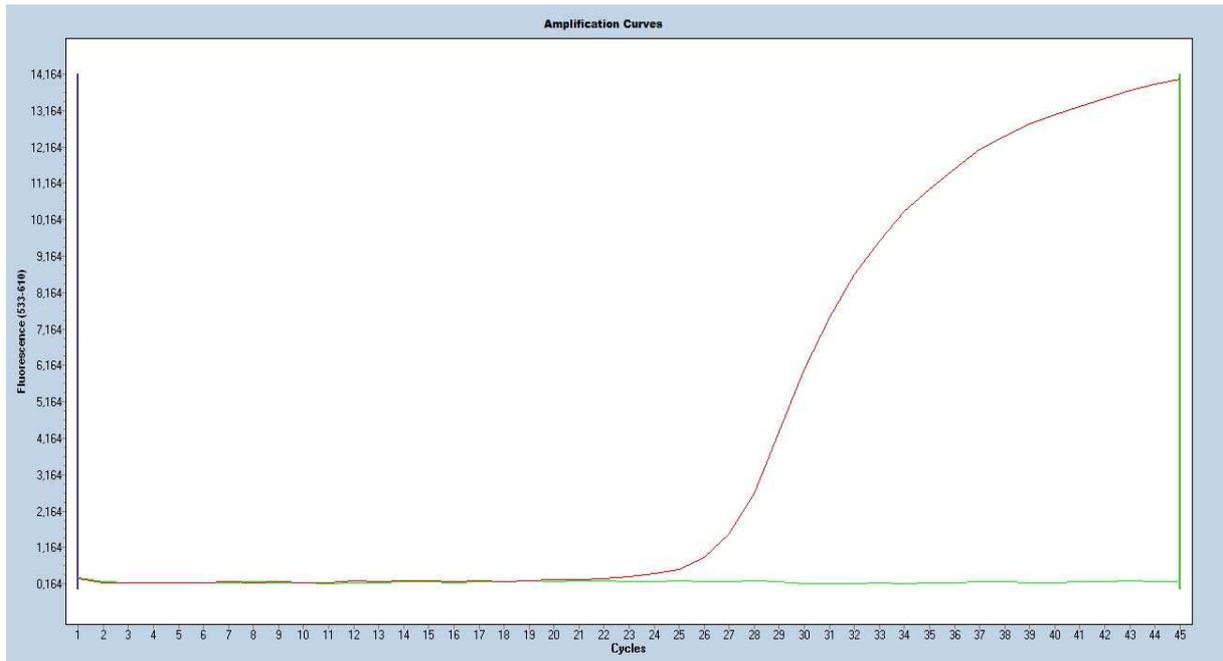


Fig. 3: Esecuzione corretta del controllo positivo e del controllo negativo (*Entamoeba histolytica*) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

Tab. 11: Interpretazione del campione

Geni target			ICD	Risultato
<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Crypto. spp.</i>		
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> rilevata
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>E. histolytica</i> rilevata
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Crypto. spp.</i> rilevate
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> ed <i>E. histolytica</i> rilevate
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> e <i>Crypto. spp.</i> rilevate
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>E. histolytica</i> e <i>Crypto. spp.</i> rilevate
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i>, <i>E. histolytica</i> e <i>Crypto. spp.</i> rilevate
negativo	negativo	negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	negativo	negativo	Non valido

Giardia lamblia, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* vengono rilevati, se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione ed è osservato un segnale di amplificazione per **Internal Control DNA** nel sistema di rilevazione.

Giardia lamblia, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* sono inoltre rilevati se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale di amplificazione per **Internal Control DNA** nel sistema di rilevazione. La rilevazione dell' **Internal Control DNA** non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale del controllo di amplificazione interno sia debole o assente.

Giardia lamblia, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* non vengono rilevati se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione e viene osservato un segnale di amplificazione per **Internal Control DNA** nel sistema di rilevazione. L'inibizione della reazione PCR o un errore nella procedura di estrazione possono essere esclusi dalla rilevazione di **Internal Control DNA** .

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

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci.
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 rilevazione di nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA[®] GENE Parasitic Stool Panel II.
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 (ITS1-18S).

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II PCR real-time multiplex ha un limite di rilevazione maggiore o uguale a 10 copie di DNA per reazione per *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica*, rispettivamente. Le seguenti Figure 4, 5 e 6 mostrano serie di diluizioni di *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* (10^5 - 10^1 copie di DNA per μ l) sul LightCycler® 480II.

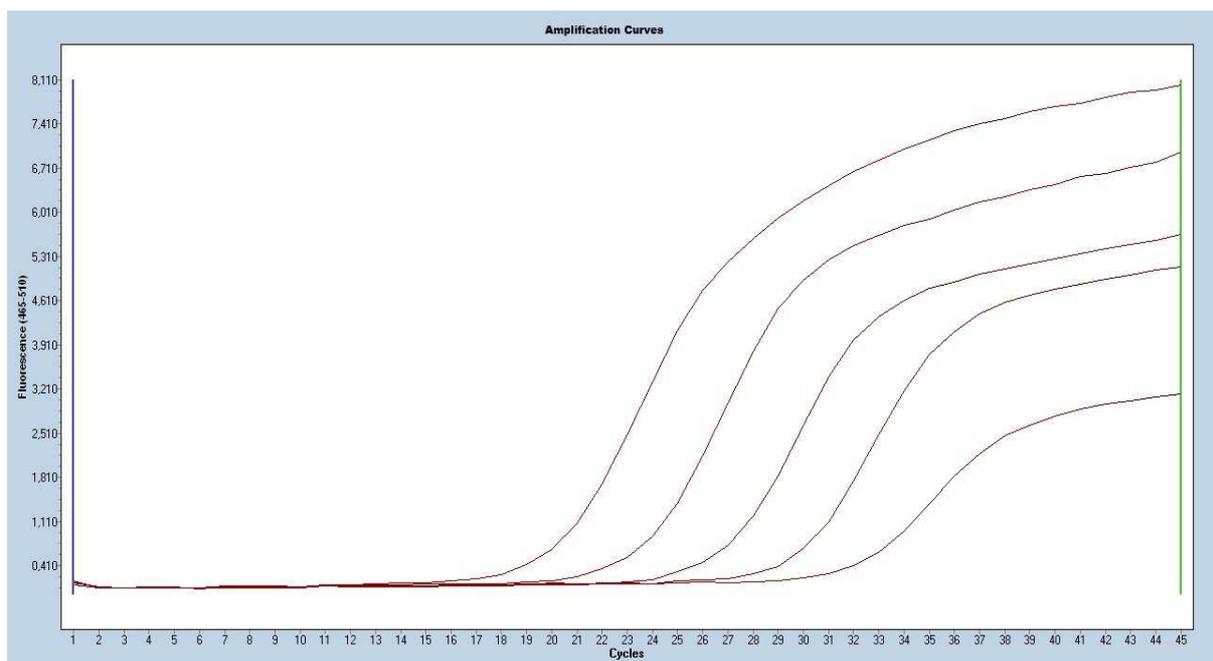


Fig. 4: Serie di diluizioni di *Giardia lamblia* (10^5 - 10^1 copie di DNA per μ l) sul LightCycler® 480II

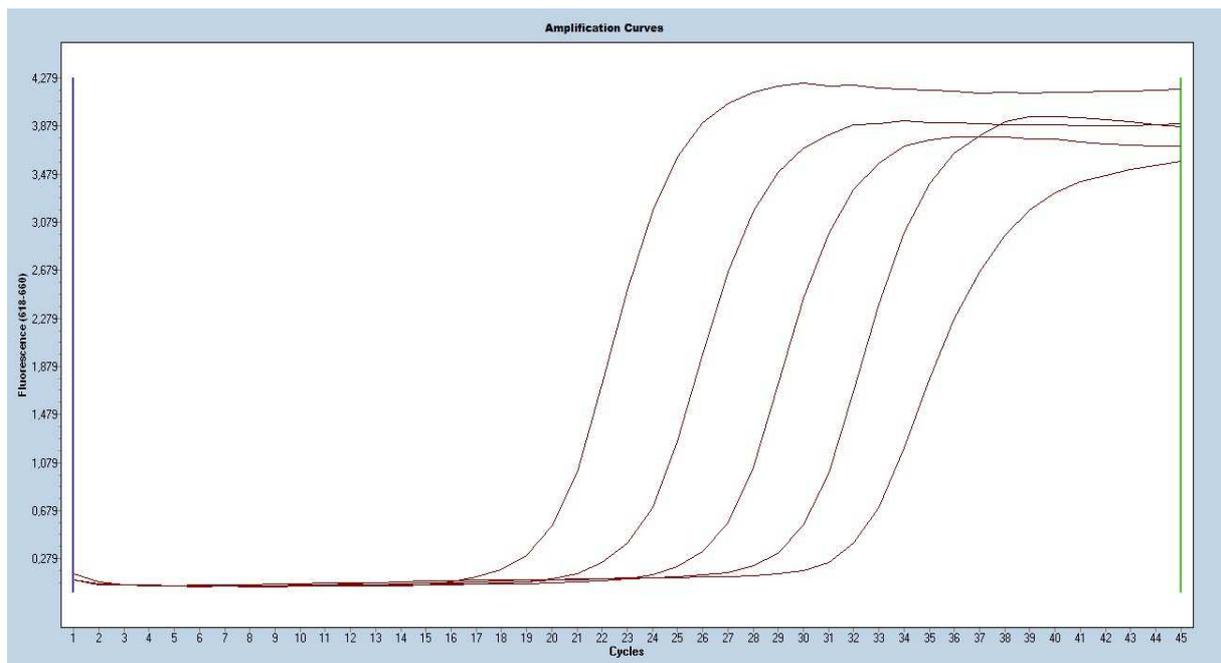


Fig. 5: Serie di diluizioni di *Cryptosporidium* spp. (10^5 - 10^1 copie di DNA per μ l) sul LightCycler[®] 480II

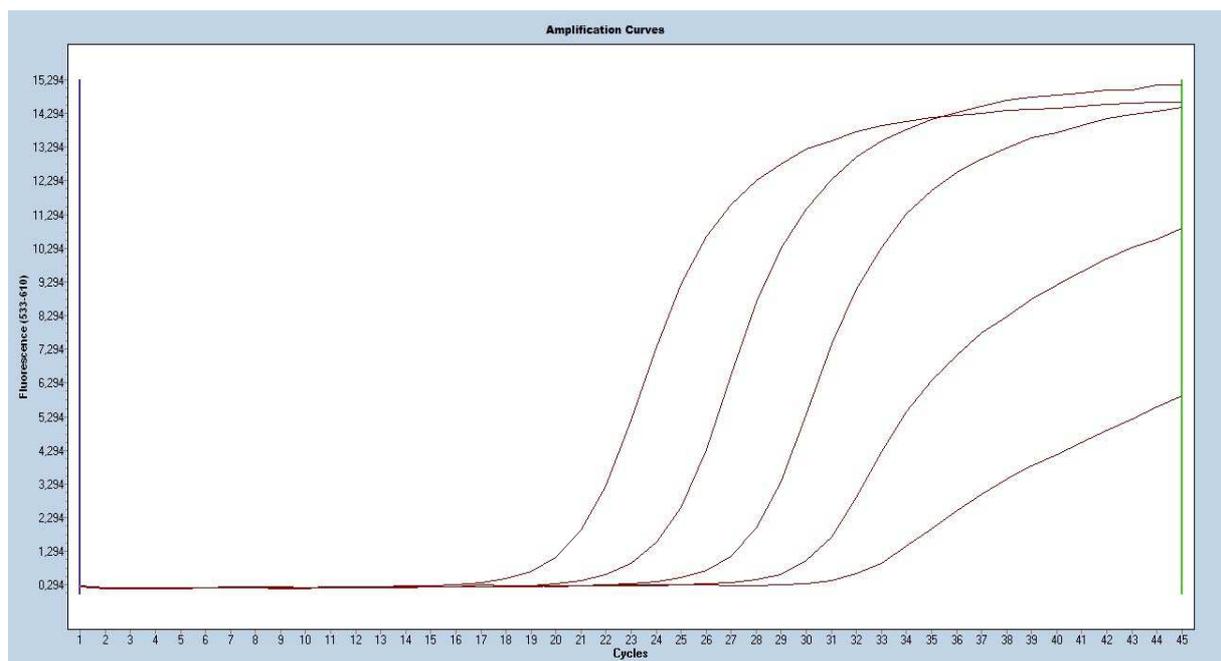


Fig. 6: Serie di diluizioni di *Entamoeba histolytica* (10^5 - 10^1 copie di DNA per μ l) sul LightCycler[®] 480II

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

13.2 Specificità analitica

La specificità analitica del test RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II PCR real-time multiplex è specifica per *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica*. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 12):

Tab. 12: Test di reattività crociata

Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Clostridium bifirmentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Echovirus Tipo 11	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Enterovirus Tipo 71	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	Coxsackievirus B4	-	Norovirus GGI	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GGII	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	

13.3 Reattività analitica

La reattività del test RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II PCR real-time multiplex è stata testata con *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* (vedere Tab. 13). Tutti i ceppi di *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* testati sono stati rilevati mediante il test RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II PCR real-time multiplex o con l'allineamento di sequenza.

Tab. 13: Test di reattività analitica

<i>Giardia lamblia</i>					
<i>Giardia lamblia</i>	+	<i>G. intestinales</i> Portland 1	+	<i>G. intestinales</i> WB Clone 6	+
<i>Entamoeba histolytica</i>					
<i>E. histolytica</i>	+				
<i>Cryptosporidium</i> spp.					
<i>C. baileyi</i>	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. sp skunk</i>	+
<i>C. bovis</i>	+	<i>C. muris</i>	+	<i>C. ubiquitum</i>	+
<i>C. canis</i>	+	<i>C. parvum</i>	+	<i>C. viatorum</i>	+
<i>C. cuniculus</i>	+	<i>C. sp horse</i>	+	<i>C. xiaoi</i>	+
<i>C. felis</i>	+				

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
11/08/2014	Versione di rilascio
09/04/2018	Revisione generale
09/04/2018	4. Contenuto della confezione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 9. Esecuzione del test 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	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. Centers for Disease Control and Prevention 2011. Giardia Epidemiology & Risk Factors, <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>. Accessed 10.07.2012.
2. Food and Drug Administration (FDA) 2011. Bad Bug Book 2nd Edition. <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodborneopathogensnaturaltoxins/badbugbook/default.htm>. Accessed 10.07.2012.
3. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>. Accessed 07.03.2014.
4. Robert Koch Institut 2010. Kryptosporidiose (Cryptosporidium parvum). RKI-Ratgeber für Ärzte 2004. Accessed 24.07.2012.
5. LEE JK, SONG HJ and Jae-Ran YU JR. Prevalence of diarrhea caused by Cryptosporidium parvum in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea. Korean J Parasitol. 2005, 43(3):111-114.
6. Leitch GJ and Qing He. Cryptosporidiosis - an overview. J Biomed Res. 2012, 25(1): 1-16.
7. Scallan E et al. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011, 17(1): 7-15.
8. Fotedar R et al. Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. Clin Microbiol Rev. 2007, 20(3):511-532.