

## RIDA® GENE Viral Stool Panel I

**REF** PG1315



## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Viral Stool Panel I è un test per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di Norovirus, Rotavirus, Adenovirus 40/41 e Astrovirus in campioni di feci umane.<sup>1,2,3,4</sup>

RIDA®GENE Viral Stool Panel I è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi di gastroenteriti causate da Norovirus, Rotavirus, Adenovirus 40/41 e Astrovirus.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

La gastroenterite acuta è una delle principali cause di morbilità e mortalità nel mondo. In particolare nei bambini, i virus enterici sono la prima causa di gastroenterite. Negli Stati Uniti, le infezioni virali causano circa 30,8 milioni di casi di gastroenterite all'anno.<sup>5</sup> I principali patogeni causa di diarrea sono i Norovirus, Rotavirus, Adenovirus e Astrovirus.

I Norovirus appartengono alla famiglia *Caliciviridae* e sono virus a filamento singolo di RNA (ssRNA). La gastroenterite causata da Norovirus si manifesta con gravi attacchi di nausea, vomito e diarrea. I Norovirus sono escreti nelle feci e con il vomito. Possono essere raggruppati in 7 genogruppi, che attualmente contano 30 genotipi e numerosi cladi. Finora, gli agenti patogeni umani sono stati descritti solo come appartenenti al genogruppo I (GI), con 9 genotipi, al genogruppo II (GII), con 22 genotipi e al genogruppo IV (GIV), con due genotipi.<sup>7,8</sup> Negli Stati Uniti, si stima che ogni anno oltre 21 milioni di casi di gastroenterite acuta, 70.000 ricoveri e 800 decessi sono provocati da infezioni da Norovirus.<sup>6</sup>

I Rotavirus sono virus a doppio filamento di RNA (dsRNA) icosaedrici non rivestiti, appartenenti alla famiglia *Reoviridae*. I sintomi dell'infezione da Rotavirus includono solitamente vomito, diarrea acquosa e dolore addominale. Il virus si trasmette per via oro-fecale attraverso le mani e altri oggetti contaminati. Il Rotavirus è la principale causa di diarrea nei bambini di età inferiore ai cinque anni e si stima sia responsabile della morte di 611.000 bambini ogni anno nel mondo.<sup>9</sup> I Rotavirus sono classificati nei sette sierogruppi A – G, dove quelli del sierogruppo A rivestono la maggiore importanza a livello epidemiologico.<sup>10</sup>

Gli Adenovirus sono virus a doppio filamento di DNA (dsDNA) icosaedrici non rivestiti, appartenenti alla famiglia *Adenoviridae*. Si distinguono 56 sierotipi di Adenovirus umano classificati in sette gruppi (A – G). Gli Adenovirus provocano prevalentemente malattie respiratorie, mentre la gastroenterite è causata principalmente dai sierotipi 40 e 41.<sup>11,12</sup>

Gli Astrovirus sono virus a singolo filamento di RNA (ssRNA) appartenenti alla famiglia *Astroviridae*. La gastroenterite astrovirale si manifesta principalmente con la diarrea, ma può accompagnarsi anche a vomito e febbre. Nei Paesi sviluppati l'incidenza degli Astrovirus è compresa fra il 2 e il 9%, e la malattia si manifesta principalmente nei bambini di età inferiore ai due anni.<sup>13</sup> Oggi se ne descrivono otto sierotipi, dei quali i più rilevanti sono quelli da 1 a 5. L'infezione viene trasmessa dagli alimenti contaminati, dall'acqua e per via oro-fecale.<sup>15</sup>

### 3. Principio del test

Il test RIDA®GENE Viral Stool Panel I è un test PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di RNA Norovirus, RNA Rotavirus, DNA Adenovirus 40/41 ed RNA Astrovirus in campioni fecali umani. La rivelazione avviene mediante RT-PCR real-time in una singola fase, ciò significa che la trascrizione inversa (RT) e la successiva PCR hanno luogo nella medesima provetta di reazione. L'RNA isolato viene trascritto in cDNA utilizzando la trascrittasi inversa. Successivamente, si verifica l'amplificazione dei frammenti genetici specifici per Norovirus (regione della giunzione ORF1/ORF2), Rotavirus (NSP3), Adenovirus 40/41 (esone) e Astrovirus (CAP, proteina del capsido).

I target amplificati vengono rivelati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher).

Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Viral Stool Panel I contiene un **Internal Control RNA** (ICR) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e 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	<b>Reaction Mix</b>	2x	1050 µl	giallo
2	<b>Enzyme Mix</b>	1x	80 µl	rosso
R	<b>Internal Control RNA</b>	2x	1700 µl	marrone
N	<b>No Template Control</b>	1x	450 µl	bianco
P	<b>Positive Control</b>	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 le prestazioni del test (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 RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Viral Stool Panel I 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
Agilent Technologies	Mx3005P

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®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 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/RNA da campioni di feci umane, utilizzare un kit di estrazione degli acidi nucleici disponibile in commercio (ad es. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione degli acidi nucleici (ad es. Maxwell® RSC (Promega)). Estrarre l'acido nucleico virale in base alle istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione, si raccomanda di diluire il campione di feci con acqua in rapporto 1:10. Vorticare vigorosamente e centrifugare a 13.000 x g per 1 minuto. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

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

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

Se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere

20 µl di **Internal Control RNA** durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control RNA** sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente al campione. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della Master Mix

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

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

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

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Enzyme Mix</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 (ICR 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>Enzyme Mix</b>	0,7 µl	7,7 µl
R	<b>Internal Control RNA</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.

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

**Campione:** dispensare 5 µl di RNA-Extract nella Master Mix pre-pipettata.

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

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

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

## 9.3 Impostazione dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo universale RT-PCR real-time

**Tab. 5:** Profilo universale RT-PCR real-time per 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 temperature / velocità di rampa	Massima

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

**Tab. 6:** Profilo di RT-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

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

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



## 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

**Tab. 7:** Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	Adenovirus	440/488	<b>È necessario il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)</b>
	Norovirus	465/510	
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	Astrovirus	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	Adenovirus	ATTO	<b>Controllare che non vi sia colorante di riferimento NOTA: Le "Impostazioni di amplificazione del set filtro" per ATTO devono essere impostate su 8</b>
	Norovirus	FAM	
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Astrovirus	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 negativo e il controllo positivo mostrino risultati corretti (vedere Tabella 8, Fig. 1, Fig. 2, Fig.3).

Il **Positive Control** per Adenovirus 40/41, Norovirus, Rotavirus e Astrovirus ha una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu$ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie.

**Tab. 8:** Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

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

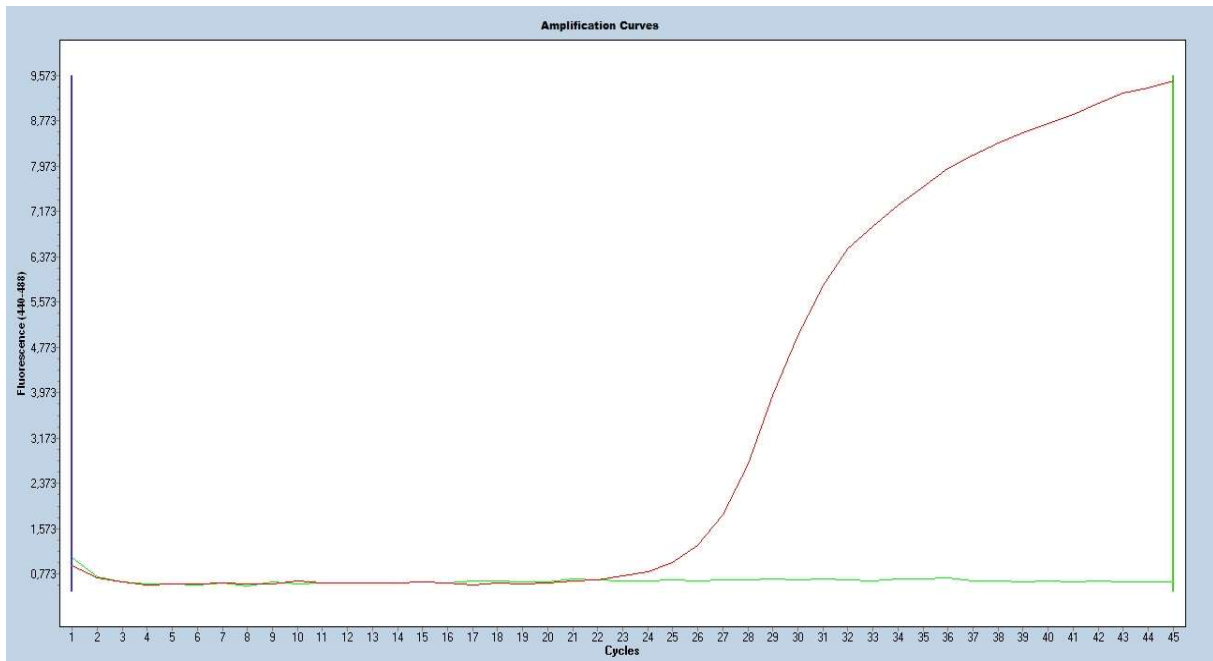
\*1 Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICR.

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

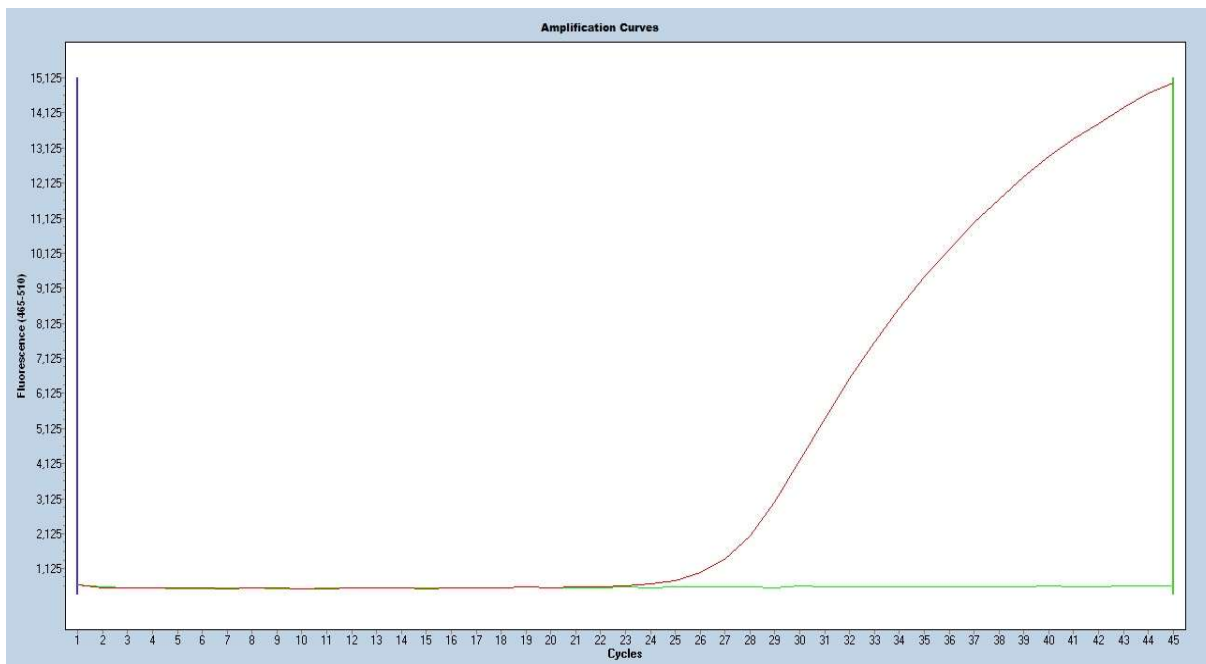
Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

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

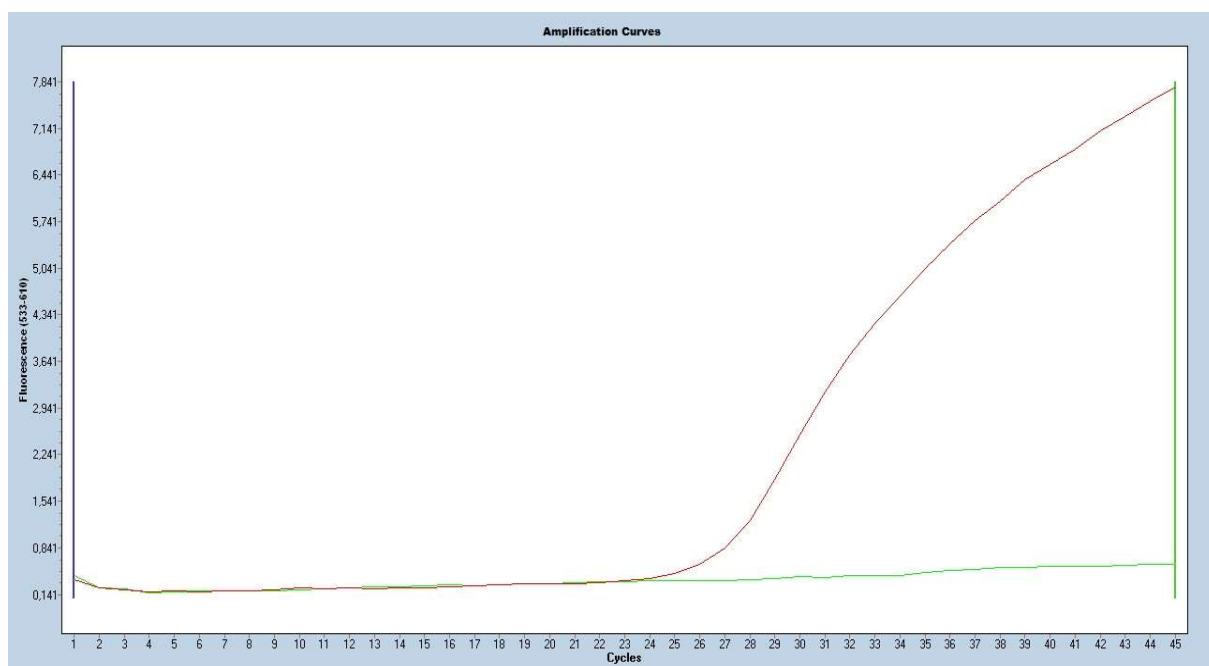
- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



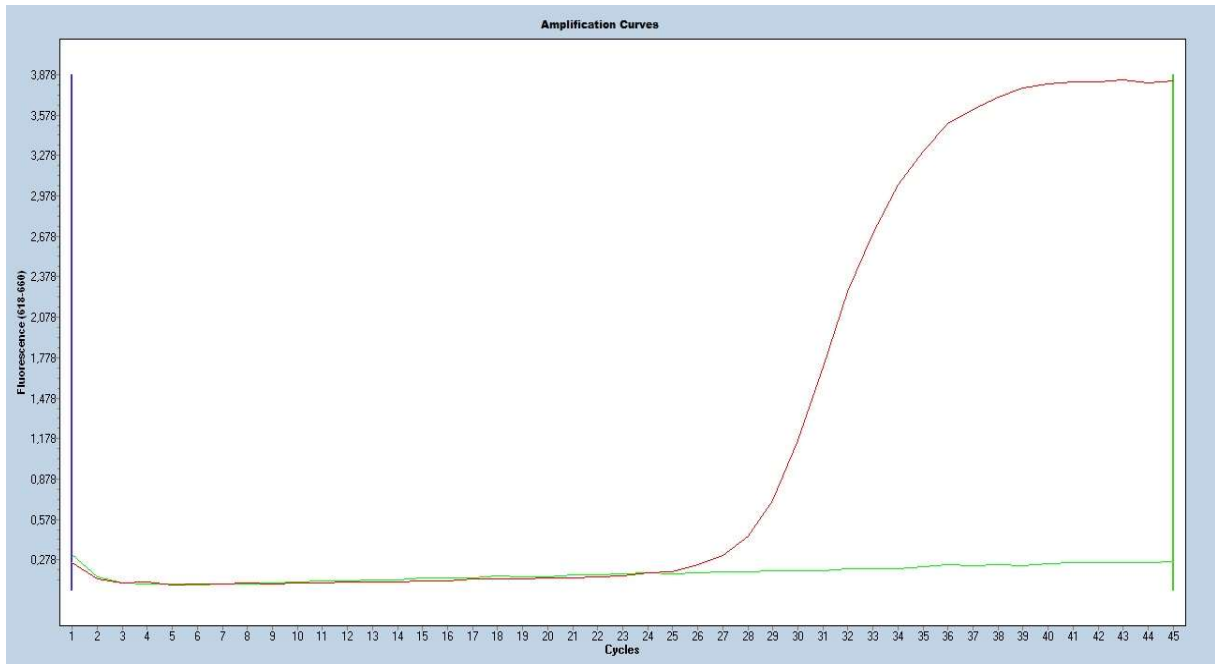
**Fig. 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (Adenovirus) sul LightCycler® 480II



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



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



**Fig. 4:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (Astrovirus) sul LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

**Tab. 9:** Interpretazione del campione

Geni target				ICR	Risultato
Adenovirus	Norovirus	Rotavirus	Astrovirus		
<b>positivo</b>	negativo	negativo	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Adenovirus rilevato</b>
negativo	<b>positivo</b>	negativo	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Norovirus rivelato</b>
negativo	negativo	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Rotavirus rilevato</b>
negativo	negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Astrovirus rilevato</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	negativo	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Adenovirus e Norovirus rilevati</b>
<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Adenovirus e Rotavirus rilevati</b>
<b>positivo</b>	negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Adenovirus e Astrovirus rilevati</b>
negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Norovirus e Rotavirus rilevati</b>
negativo	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Norovirus e Astrovirus rilvati</b>
negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Rotavirus e Astrovirus rilevati</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Adenovirus, Norovirus e Rotavirus rilevati</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Adenovirus, Norovirus e Astrovirus rilevati</b>
<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Adenovirus, Rotavirus e Astrovirus rilevati</b>
negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Norovirus, Rotavirus e Astrovirus rilevati</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Adenovirus, Norovirus, Rotavirus e Astrovirus rilevati</b>
negativo	negativo	negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>Geni target non rivelati</b>
negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	<b>Non valido</b>

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

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

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

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l'**Internal Control RNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

## 12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Viral Stool Panel I è convalidato solo per campioni fecali.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti virali nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre risultati falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare le nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA<sup>®</sup>GENE Viral Stool Panel I.
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 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 (Adenovirus 40/41 (esone), Norovirus (regione della giunzione ORF1/ORF2), Rotavirus (NSP3) e Astrovirus (CAP, proteina del capsid)).
8. Anche i Norovirus del genogruppo IV, i quali infettano gli esseri umani molto raramente, possono essere rivelati dal test RIDA<sup>®</sup>GENE Viral Stool Panel I.
9. Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Viral Stool Panel I individua solamente i sierotipi 40 e 41 dell'Adenovirus, ovvero quelli che causano principalmente gastroenterite. I sierotipi 1, 2, 5, 6, 12, 18 e 31 sono raramente associati alla diarrea acuta e pertanto non vengono rilevati da questo test di PCR real-time.

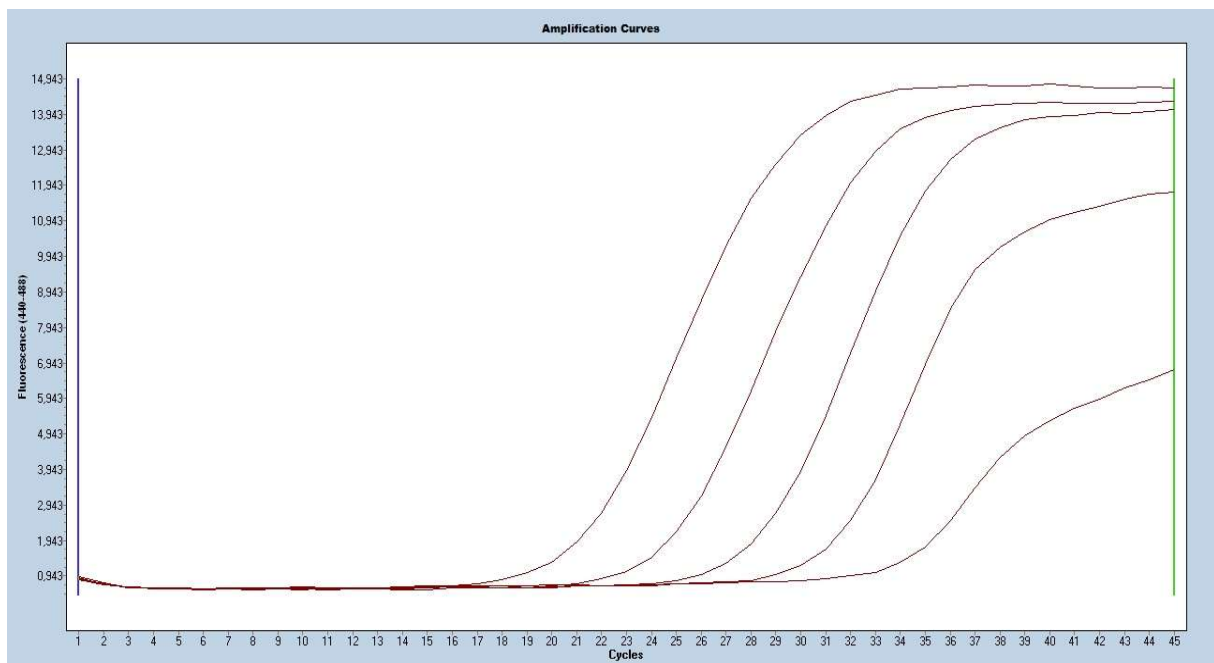
10. La mucina può presentare caratteristiche di interferenza a una concentrazione del 2,5 % (v/v) o superiore.

### 13. Prestazioni e caratteristiche

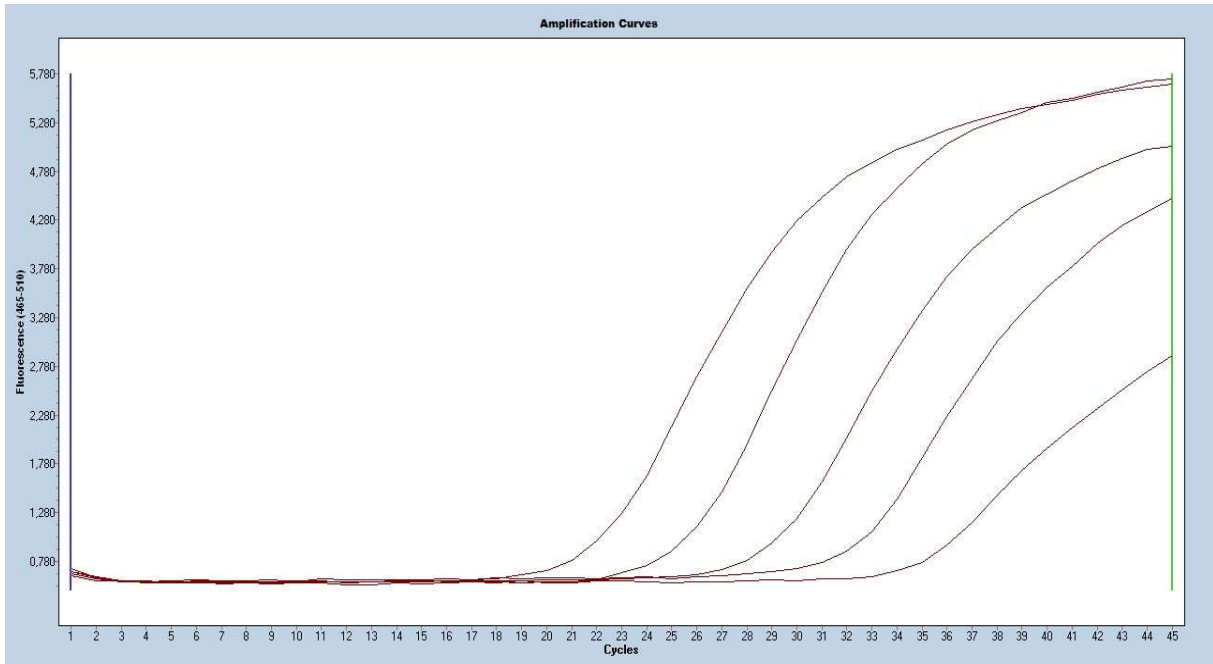
#### 13.1 Sensibilità analitica

Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Viral Stool Panel I ha un limite di rivelazione maggiore o uguale a 50 copie di RNA per reazione.

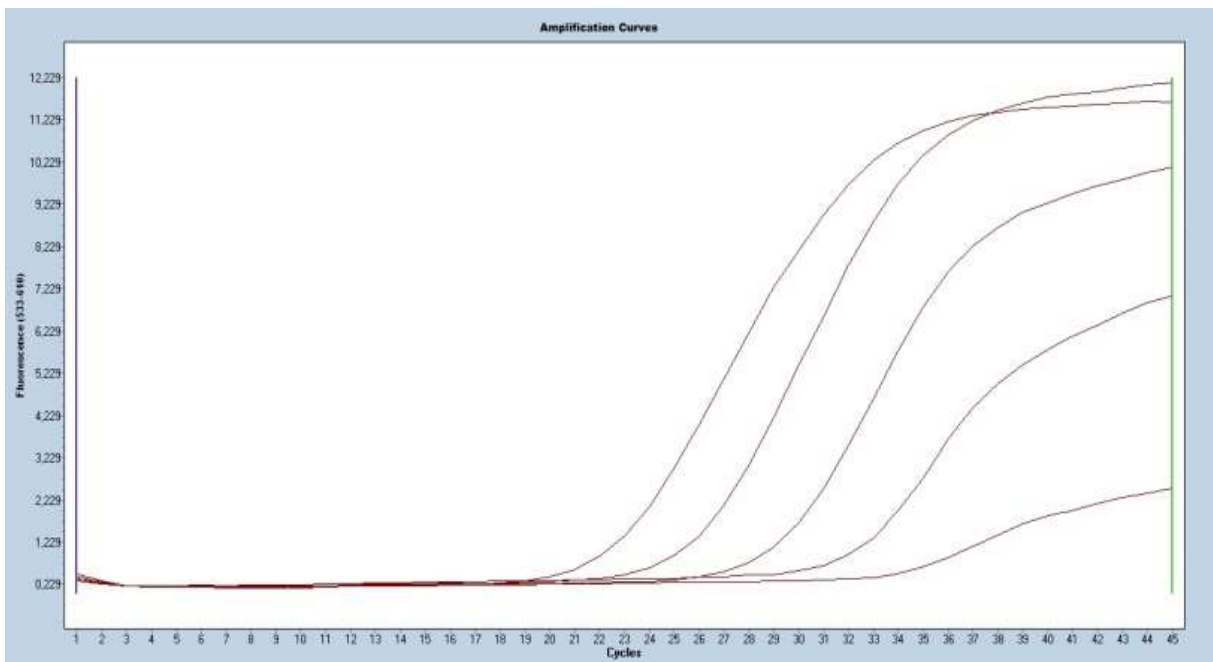
Le figure 5, 6, 7 e 8 mostrano le serie di diluizione di Adenovirus ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ), Norovirus, Rotavirus e Astrovirus ( $10^5 - 10^1$  copie di RNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II.



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

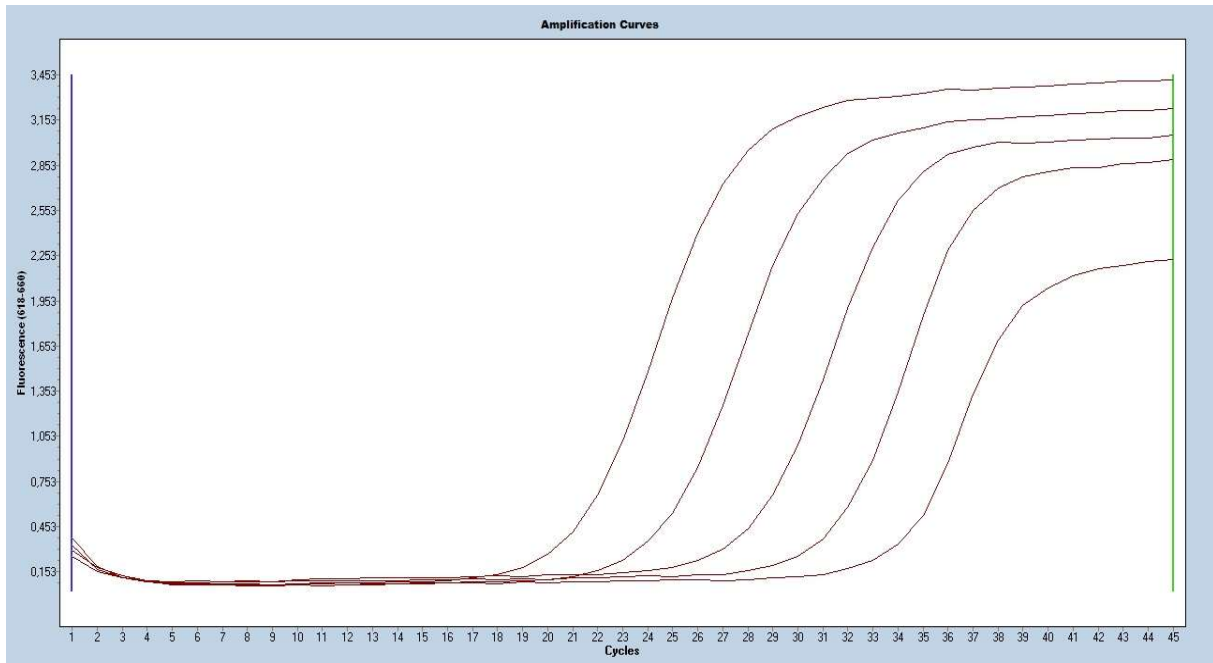


**Fig. 6:** Serie di diluizione del Norovirus ( $10^5 - 10^1$  copie di RNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig. 7:** Serie di diluizione del Rotavirus ( $10^5 - 10^1$  copie di RNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II





**Fig. 8:** Serie di diluizione dell'Astrovirus ( $10^5 - 10^1$  copie di RNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II

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

## 13.2 Specificità analitica

La specificità analitica del test PCR real-time multiplex RIDA®GENE Viral Stool Panel I è specifica per Adenovirus, Norovirus (genogruppo I e II), Rotavirus e Astrovirus. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 10):

**Tab. 10:** Test di reattività crociata

Tipo di Adenovirus: 4	-	<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Tipo di Adenovirus: 5	-	<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Tipo di Adenovirus: 7A	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Tipo di Adenovirus: 11	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Tipo di Adenovirus: 31	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Tipo di Adenovirus: 37	-	<i>Clostridium bifirmentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-				

### 13.3 Reattività analitica

La reattività del test PCR real-time multiplex RIDA®GENE Viral Stool Panel I è stata testata con Adenovirus, Norovirus, Rotavirus e Astrovirus (vedere Tab.11). Tutti i sierogruppi di Adenovirus, Rotavirus e Astrovirus testati e i genogruppi di Norovirus testati sono stati rilevati con il test PCR multiplex real-time RIDA®GENE Viral Stool Panel I o mediante allineamento di sequenze (\*).

**Tab. 11:** Test di reattività analitica










Adenovirus					
Sierotipo 40	+	Sierotipo 41	+		
Norovirus					
Genogruppo I					
GGI.1 – Norwalk	+	GGI.3 – Desert Shield, Birmingham	+	GGI.6 – Hesse	+
GGI.2 – Southhampton, Whiterose	+	GGI.4 – Chiba, Malta	+	GGI.7 – Winchester	+
GGI.2 – Southhampton, Southhampton	+	GGI.5 – Musgrove	+	GGI.8 – Boxer	+
Genogruppo II					
GGII.1 – Hawaii	+	GGII.4 – Sydney 2012	+	GGII.17 – Kawasaki	+
GGII.2 – Melksham	+	GGII.6 – Seacroft	+	GGII.b – Hilversum	+
GGII.3 – Toronto	+	GGII.7 – Leeds	+	GGII.c – Den Haag	+
GGII.4 – Bristol, Grimsby 2004	+	GGII.10 – Erfurt	+		
Genogruppo IV					
GGIV.1 – Alpatron	+				
Rotavirus					
Sierogruppo A					
Sierotipo G1	+	Sierotipo G2	+	Sierotipo G3	+
Sierotipo G4	+	Sierotipo G9	+	Sierotipo G12	+
Astrovirus					
Sierotipo 1*	+	Sierotipo 2	+	Sierotipo 3*	+
Sierotipo 4*	+	Sierotipo 5*	+	Sierotipo 7*	+
Sierotipo 8	+				

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-06-14	Versione precedente
2021-01-27	Revisione generale 10. Controllo qualità (errore d'ortografia) 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

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

### Simboli specifici nel test

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Bibliografia

1. Hoehne M, *et al.* Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infectious Diseases*. 2006; 6:69-75.
2. Pang XL, *et al.* Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens From Children With Diarrhea. *Journal of Medical Virology* 2004, 72: 496–501.
3. Heim A, *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003, 10: 228-239.
4. Kapoor A, *et al.* Multiple novel Astrovirus species in human stool. *Journal of general Virology* 2009, 90: 2965-2972.
5. Mead PS, *et al.* *EID* 1999, 5: 607-625.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
7. Parra GI, *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017, 13(1): e1006136.
8. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal Clinical Microbiology* 2015, 53(2):373-81.
9. Parashar UD, *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12: 304-306.
10. Robert Koch Institut. Rotaviren-Gastroenteritis. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten. Stand 31.07.2013.  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Rotaviren.html;jsessionid=D381EC22661EBE5C847628E9368E3401.2\\_cid381#doc2374564bodyText8](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Rotaviren.html;jsessionid=D381EC22661EBE5C847628E9368E3401.2_cid381#doc2374564bodyText8). Aufgerufen am 09.07.2018.
11. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitiden durch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
12. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.
13. Guix S, *et al.* Human astrovirus diagnosis and typing: current and future Prospects. *Letters of Applied Microbiology* 2005, 41:103-105.
14. Wilhelmi I, *et al.* Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection* 2003, 9: 247-262.
15. Guix S, *et al.* Human Astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2014, 27:1048-1074.