

## RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I

**REF** PG1715



## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA<sup>®</sup>GENE Parasitic Stool Panel I è un test PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* e *Dientamoeba fragilis* in campioni fecali umani.

Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Parasitic Stool Panel I 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* spp., *Entamoeba histolytica* e *Dientamoeba fragilis* 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 contraggono l'infezione da giardiasi.<sup>1</sup> Il CDC stima circa 77.000 casi di giardiasi ogni anno negli Stati Uniti.<sup>2</sup> 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.<sup>1</sup> *Cryptosporidium parvum* è una delle numerose specie del genere *Cryptosporidium*. Oltre a *C. parvum*, anche *C. hominis* causa comunemente criptosporidiosi nell'uomo.<sup>4</sup> Tuttavia, anche le infezioni causate da altri *Cryptosporidium* spp. come *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, e *C. muris* possono causare sintomi clinici.<sup>3</sup> La criptosporidiosi è stata rivelata 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 rivelato *Cryptosporidium* spp. fino al 14-24 % mentre fino al 5 % dei pazienti asintomatici con HIV erano infetti.<sup>5,6</sup> Durante un'epidemia a Milwaukee (Stati Uniti) nel 1993, oltre 400.000 persone erano ammalate.<sup>4</sup> Ogni anno si stima che negli Stati Uniti si verificano 748.000 casi di criptosporidiosi.<sup>7</sup> 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. I soggetti immunocompromessi spesso sviluppano malattie gravi, croniche e talvolta fatali.<sup>2,4</sup>

*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 (ascesso 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.<sup>2,8</sup>

La *Dientamoeba fragilis* è presente in tutto il mondo e studi recenti hanno dimostrato il potenziale patogeno del virus, indicandolo come una causa comune delle malattie gastrointestinali. L'infezione da *D. fragilis* può essere sintomatica o asintomatica. I sintomi della dientamoebiasi sono dolore addominale e diarrea. La prevalenza di *D. fragilis* varia dallo 0,3% al 52% e spesso supera quella della *Giardia lamblia*.<sup>9,10</sup>

Tipicamente, la diagnosi di infezione da *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. e *Dientamoeba fragilis* avviene mediante l'esame microscopico di campioni fecali, a opera di personale esperto. Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Parasitic Stool Panel I 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 rivelazione simultanea dei parassiti più importanti che causano diarrea (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* e *Dientamoeba fragilis*).

### 3. Principio del test

RIDA<sup>®</sup>GENE Parasitic Stool Panel I è un test PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* e *Dientamoeba fragilis* 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., *Entamoeba histolytica* e *Dientamoeba fragilis*. I target amplificati per *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* e *Dientamoeba fragilis* vengono rivelati 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<sup>®</sup>GENE Parasitic 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

**Tabella 1:** Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice	Reagente	Quantità	Colore del coperchio
--------	----------	----------	----------------------

del kit				
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.
- Scongellare i reagenti con cura e completamente prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 15 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 e dispositivi aggiuntivi necessari

Il test RIDA<sup>®</sup> GENE Parasitic 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:

**Tabella 2:** Attrezzatura necessaria

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

Se per la PCR real-time si preferisce utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti, 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'utilizzo 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 (priva di nucleasi)**

## 7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si manipolano i campioni o i reagenti.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in locali separati per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Raccolta e conservazione dei 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 fecali 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<sup>®</sup>GENE Parasitic stool panel I contiene un Internal Control DNA che rivela 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 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. 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 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.

**Avvertenze:** 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 eluato nella Master Mix pre-pipettata.

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

**Avvertenze:** 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 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 del DNA 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

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

**Tabella 6:** Profilo della PCR real time del DNA 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

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

### 9.3.2 Profilo PCR real-time universale

**Avvertenze:** il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA<sup>®</sup> GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

**Tabella 7:** Profilo PCR real-time universale per il LightCycler<sup>®</sup> 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

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

**Tabella 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

**Avvertenze:** 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
Roche LightCycler® 480II	<i>Dientamoeba fragilis</i>	440/488	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessario
	<i>Giardia lamblia</i>	465/510	
	ICD	533/580	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	533/610	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Dientamoeba fragilis</i>	ATTO	Controllare che non vi sia il colorante di riferimento Le "Impostazioni di amplificazione del set filtro" per ATTO devono essere impostate su 8
	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	
	ICD	HEX	
	<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, Fig. 4).

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
Controllo positivo	Positivo	NA * <sup>1</sup>	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

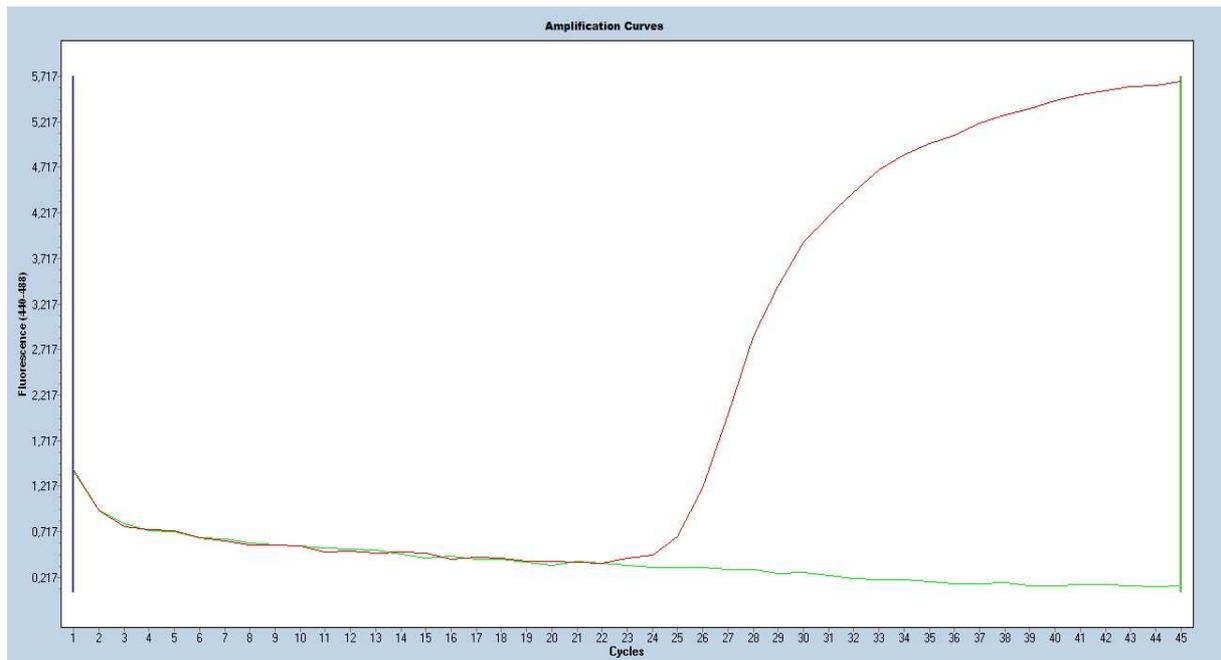
\*<sup>1</sup> Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

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.

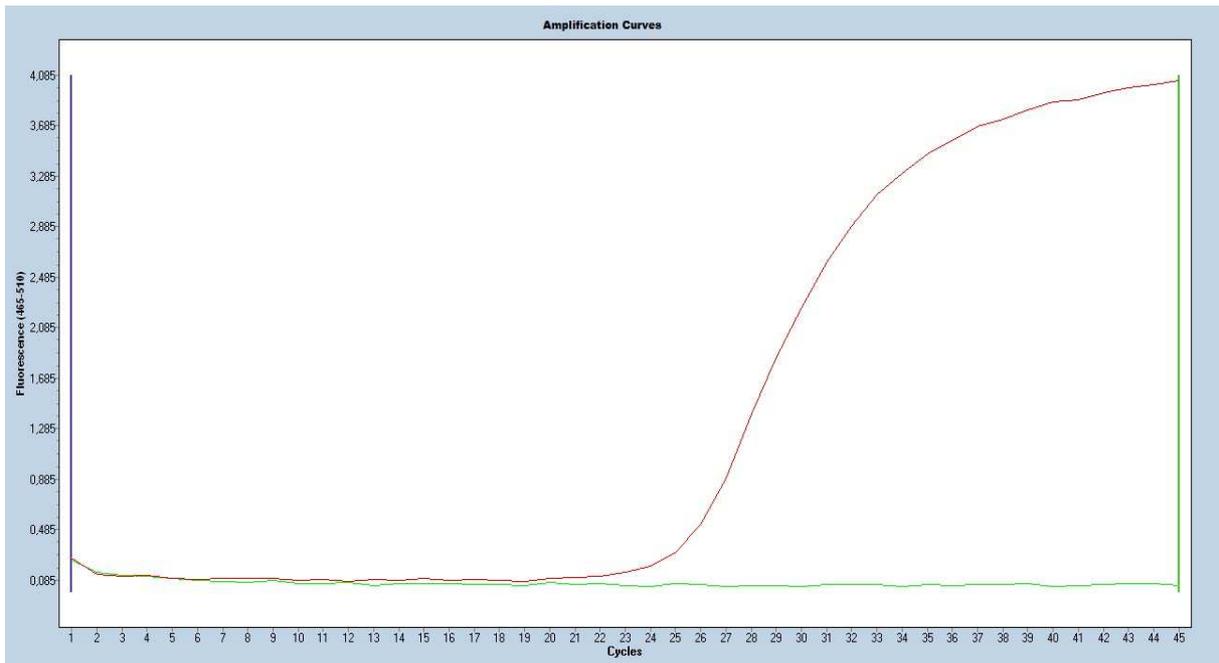
Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

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

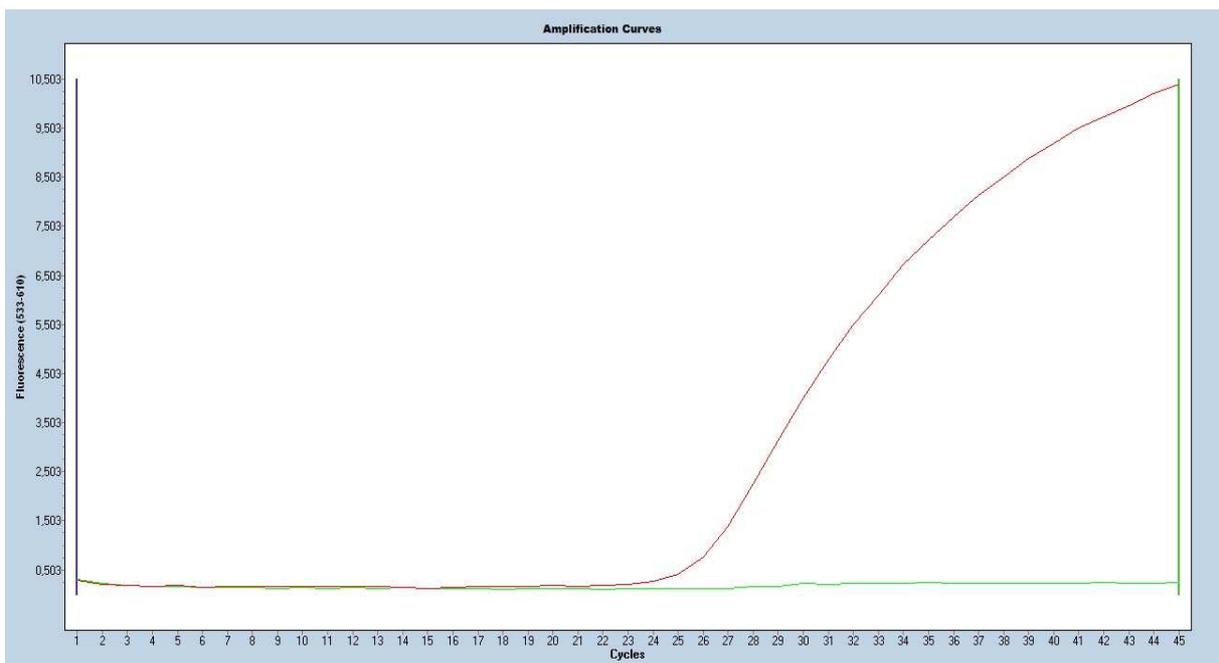
- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



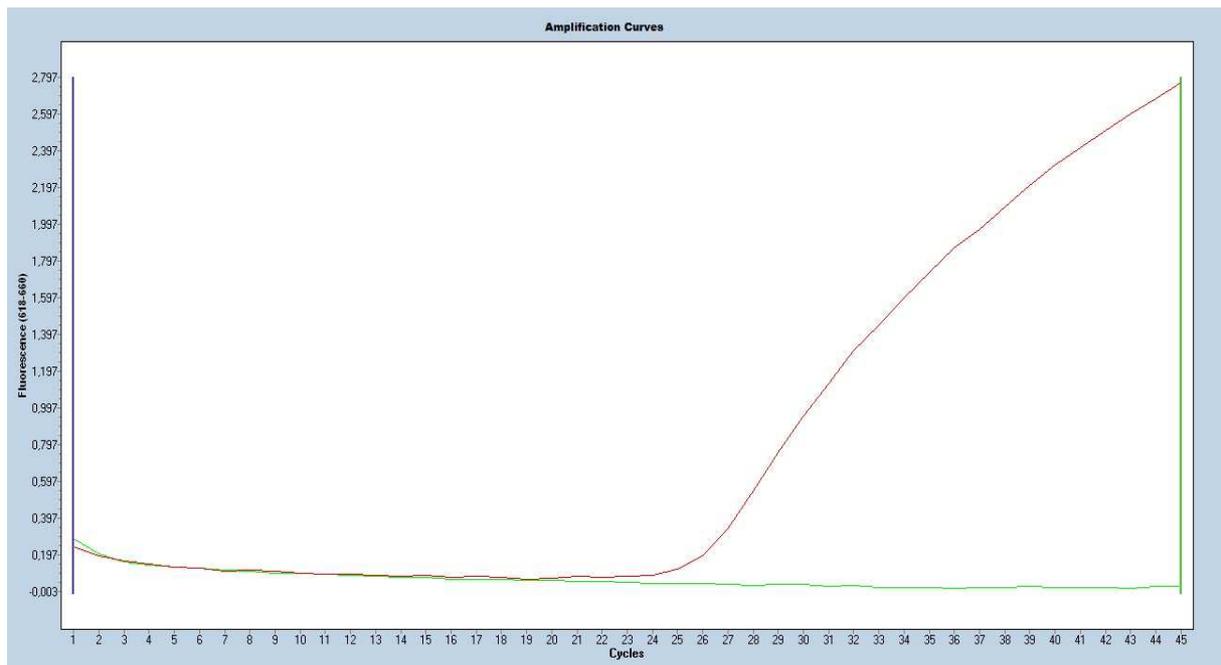
**Fig. 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e negativo (verde) (*Dientamoeba fragilis*) sul LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Giardia lamblia*) sul LightCycler® 480II



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



**Fig. 4:** Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Cryptosporidium* spp.) sul LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tabella 11:** Interpretazione del campione

Geni target					
<i>D. fragilis</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Crypto. spp.</i>	ICD	Risultato
<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>D. fragilis</i>
Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>G. lamblia</i>
Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>E. histolytica</i>
Negativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>Cryptosporidium spp.</i>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>D. fragilis</i> e <i>G. lamblia</i>
<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>D. fragilis</i> e <i>E. histolytica</i>
<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>D. fragilis</i> e <i>Cryptosporidium spp.</i>
Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>G. lamblia</i> e <i>E. histolytica</i>
Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>G. lamblia</i> e <i>Cryptosporidium spp.</i>
Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>E. histolytica</i> e <i>Cryptosporidium spp.</i>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> e <i>E. histolytica</i>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> e <i>Cryptosporidium spp.</i>
<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>D. fragilis</i> , <i>E. histolytica</i> e <i>Cryptosporidium spp.</i>
Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> e <i>Cryptosporidium spp.</i>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/ Negativo</b>	Rivelazione di <i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> e <i>Cryptosporidium spp.</i>
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	Geni target non rivelati
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<b>Negativo</b>	Non valido

Un campione è valutato come positivo se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione ed è presente un segnale di amplificazione per l'**Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione.

Un campione è valutato come positivo anche se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'**Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione 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.

Un campione è valutato come negativo se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale di amplificazione per l'**Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. 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

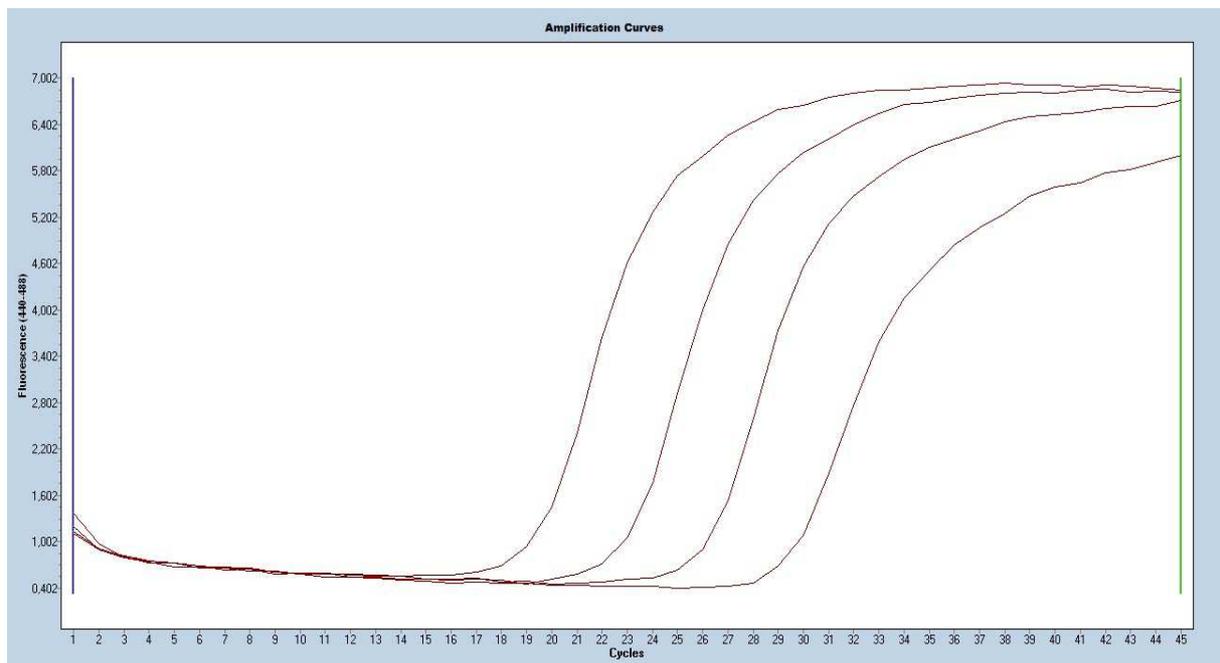
1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei 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<sup>®</sup> GENE Parasitic Stool Panel I.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, possono essere rivelati livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD), 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

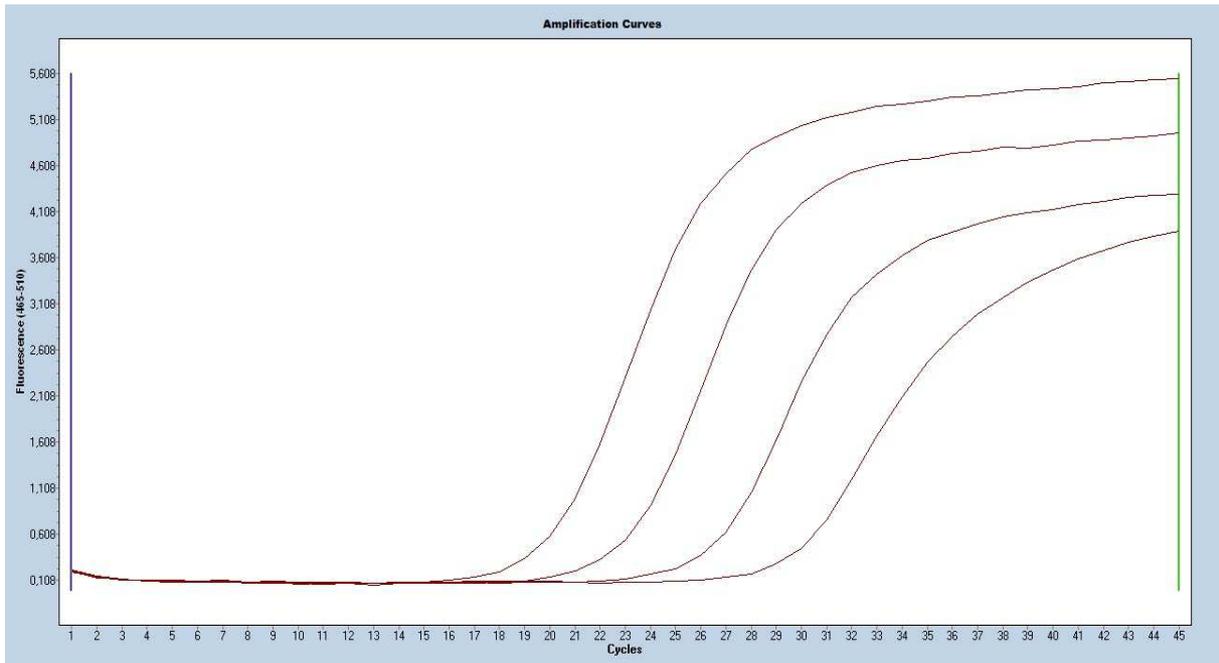
### 13.1 Sensibilità analitica

Il test RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I PCR real-time multiplex ha un limite di rivelazione maggiore o uguale a 50 copie di DNA per reazione per *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica*, rispettivamente.

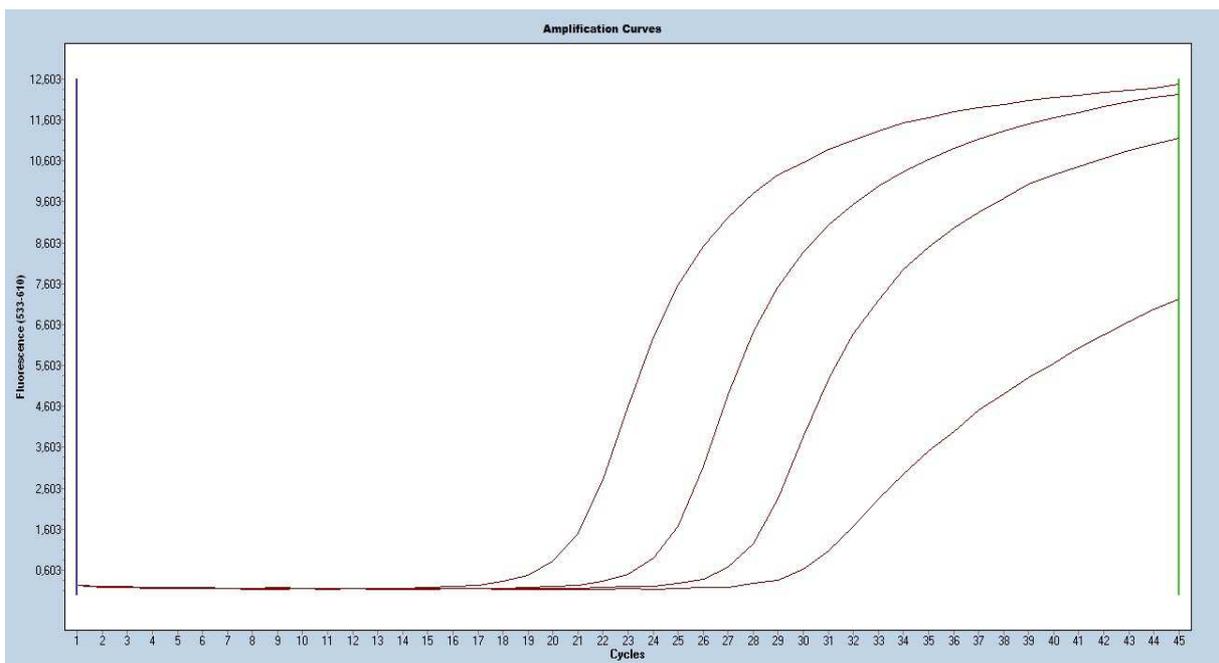
Le Figure 5, 6, 7 e 8 riportate di seguito mostrano serie di diluizioni di *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* ( $10^5$  -  $10^2$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler® 480II.



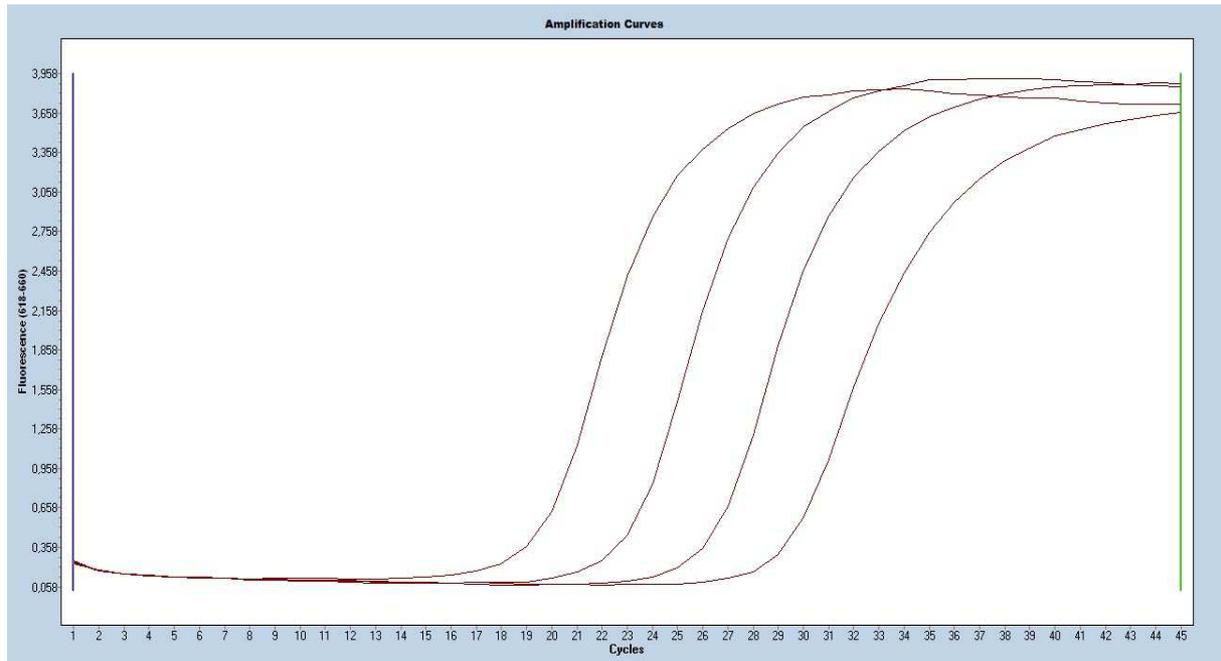
**Fig. 5:** Serie di diluizioni di *Dientamoeba fragilis* ( $10^5$  –  $10^2$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler® 480II



**Fig. 6:** Serie di diluizioni di *Giardia lamblia* ( $10^5 - 10^2$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II



**Fig. 7:** Serie di diluizioni di *Entamoeba histolytica* ( $10^5 - 10^2$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II



**Fig. 8:** Serie di diluizioni di *Cryptosporidium* spp. ( $10^5 - 10^2$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II

Il limite di rivelazione 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<sup>®</sup> GENE Parasitic Stool Panel I PCR real-time multiplex è specifica per *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica*. Non è stata individuata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 12):

**Tabella 12:** Test di reattività crociata

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

### 13.3 Reattività analitica

La reattività del test RIDA<sup>®</sup> GENE Parasitic Stool Panel I PCR real-time multiplex è stata testata con *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium* spp. (vedere Tabella 13). Tutti i ceppi di *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium* spp. testati sono stati rivelati mediante il test RIDA<sup>®</sup> GENE Parasitic Stool Panel I PCR real-time multiplex o con l'allineamento di sequenza (\*).

**Tabella 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
2019-04-09	Revisione generale 4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari 7. Precauzioni per gli utilizzatori 8. Raccolta e conservazione dei campioni 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 11. Interpretazione del risultato 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 test

Non pertinente

## 16. Bibliografia

1. Centers for Disease Control and Prevention 2011. Giardia Epidemiology & Risk Factors, <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>. Aufgerufen am 10.07.2012.
2. Food and Drug Administration (FDA) 2011. Bad Bug Book 2nd Edition. <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/default.htm>. Aufgerufen am 10.07.2012.
3. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>. Aufgerufen am 07.03.2014.
4. Leitch GJ und Qing He. Cryptosporidiosis - an overview. J Biomed Res. 2012, 25(1): 1-16.
5. Lee JK *et al.* Prevalence of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea . Korean J Parasitol. 2005, 43(3):111-114.
6. Robert Koch Institut 2010. Kryptosporidiose (*Cryptosporidium parvum*). RKI-Ratgeber für Ärzte 2004. Aufgerufen am 24.07.2012.
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.
9. Stark D *et al.* A review of the clinical presentation of *dientamoebiasis*. Am J Trop Med Hyg. 2010, 82(4):614-9.
10. Baratt JLN *et al.* A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. Gut Microbes. 2011, 2(1):3-12.