

RIDA® UNITY Bacterial Stool Panel

REF UN2405



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Germania

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel, eseguito sulla piattaforma RIDA®UNITY è una PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione del DNA di *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* in campioni fecali umani non trattati di soggetti con segni e sintomi di gastroenterite acuta.

Il test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel è destinato a supportare la diagnosi differenziale di infezioni batteriche (*Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*) in pazienti con sintomi di gastroenterite in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono un'infezione da *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. o *Yersinia enterocolitica* e non devono essere usati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

2. Sintesi e spiegazione del test

Le malattie diarroiche sono un problema sanitario significativo e causano circa 1,7 miliardi di casi all'anno nei bambini di tutto il mondo ⁽¹⁾. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), con circa 525.000 morti all'anno, sono la seconda causa di morte nei bambini sotto i 5 anni di età, soprattutto nei paesi in via di sviluppo ⁽¹⁾. Le infezioni da *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* sono cause comuni di casi di diarrea batterica ⁽²⁾.

In tutto il mondo, le specie di *Campylobacter* sono una delle quattro cause più comuni di diarrea batterica ⁽³⁾. Negli Stati Uniti, questi patogeni causano circa 1,5 milioni di casi (campilobatteriosi) all'anno. ⁽⁴⁾ Secondo il Robert Koch Institute (RKI), l'incidenza in Germania è di 80–90 casi di malattia ogni 100.000 persone. ⁽⁵⁾ La stragrande maggioranza delle infezioni da *Campylobacter* è causata da *C. Jejuni*, la cui incidenza mondiale supera persino quella di *E. Coli* ^(2, 3). *C. Coli* è un'altra specie importante all'interno del genere ed è responsabile dell'1–25% di tutti i casi di diarrea indotta da *Campylobacter* ⁽³⁾. Le infezioni da *Campylobacter* nell'uomo sono principalmente legate al cibo. La principale via di trasmissione è infatti il consumo di carne contaminata e poco cotta, così come di latte crudo e acqua contaminata. La dose infettiva è relativamente bassa ed è pari a 500 batteri ⁽⁵⁾. Il tempo di incubazione tipico di *Campylobacter* spp. è compreso tra 1 e 7 giorni, con vari sintomi di malattia. I sintomi caratteristici della campilobatteriosi sono diarrea con feci da acquose a sanguinolente, febbre, debolezza e gastralgia ^(2, 5).

Anche le specie di *Salmonella* sono una delle principali cause di gastroenterite nel mondo. Il genere *Salmonella* si suddivide in 2 specie, *S. enterica* e *S. bongori*, e attualmente comprende circa 2.500 sierotipi. La salmonella può causare tre forme di salmonellosi: non invasiva e non tifoidea, invasiva e non tifoidea e febbre tifoidea ⁽²⁾. Secondo i Centers for Disease Control and Prevention (CDC), negli USA si registrano circa 1,35 milioni di casi di salmonellosi all'anno, con oltre 26.500 ricoveri

e 420 decessi ⁽⁶⁾. La maggior parte dei casi di salmonellosi è causata da *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Il tifo, invece, è causato da *S. typhi* e *S. paratyphi* A, B o C ⁽⁷⁾. In tutto il mondo si registrano quasi 22 milioni di casi di tifo all'anno, con 200.000 decessi ⁽⁸⁾. La salmonella si trasmette attraverso il consumo di uova o prodotti a base di uova preparati in modo improprio, carne cruda, acqua contaminata o contatto con animali infetti ⁽⁷⁾. La dose infettiva di salmonella varia da 1 a 1.000 batteri. La salmonellosi si manifesta dopo un periodo di incubazione compreso fra 6 e 72 ore con sintomi clinici come nausea, vomito, crampi allo stomaco, diarrea, febbre e mal di testa ^(2, 7). I soggetti colpiti dal tifo manifestano mal di testa, dolore agli arti, febbre alta (da 39 °C a 41 °C) e disturbi addominali entro 2 o 3 giorni ⁽⁸⁾.

Yersinia enterocolitica è una delle tre specie di *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) del genere *Yersinia*. *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* possono causare yersiniosi intestinale. Secondo i CDC, negli Stati Uniti si registrano circa 117.000 casi di *Y. enterocolitica* ogni anno, con 640 ricoveri ospedalieri e 35 decessi ⁽⁹⁾. L'infezione da *Y. enterocolitica* proviene da cibo contaminato, specialmente carne di maiale cruda o poco cotta o acqua contaminata ⁽¹⁰⁾. Dopo un periodo di incubazione da 3 a 7 giorni, i soggetti colpiti da yersiniosi manifestano diarrea, vomito e dolori addominali. I sintomi possono durare fino a 3 settimane ^(10, 11).

3. Principio del test

Il test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel è una PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta di *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* in campioni fecali umani.

La processazione è completamente automatizzata con il sistema RIDA®UNITY. In primo luogo, gli acidi nucleici vengono estratti utilizzando il RIDA®UNITY Universal Extraction Kit e l'Internal Control Kit.

La sequenza target viene rivelata mediante RT-PCR real-time in una singola fase: la trascrizione inversa (RT) e la successiva PCR sono eseguite nella medesima cuvetta di reazione. Nel processo, l'RNA isolato viene trascritto in cDNA con l'ausilio di una trascrittasi inversa. I frammenti genici specifici per *Campylobacter* spp. (16S rDNA), *Salmonella* spp. (ttr) e *Yersinia enterocolitica* (ystA/ystB) vengono poi amplificati mediante PCR real-time.

Le sequenze target amplificate di *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Y. enterocolitica* vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target, le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la Taq Polymerase separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica di uno strumento di PCR real-time. Il segnale fluorescente aumenta con la quantità di ampliconi formati. Contemporaneamente, deve essere utilizzato il RIDA®UNITY Internal Control Kit per poter verificare la preparazione del campione e/o la potenziale inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni.*

Tabella 1: Contenuto della confezione

Reagente	Quantità		Colore del tappo
Reaction Mix	1 ×	1935 µL	giallo, pronto per l'uso
Enzyme Mix	1 ×	350 µL	rosso, pronto per l'uso
Positive Control	1 ×	200 µL	blu, pronto per l'uso
Negative Control	1 ×	450 µL	bianco, pronto per l'uso

*Con un utilizzo ripetuto e in serie più piccole, il numero di reazioni può ridursi.

5. Istruzioni di conservazione

- Seguire le linee guida per la manipolazione contenute nella Tabella 2 e riporre il kit immediatamente dopo l'uso attenendosi alle informazioni specificate.
 - I reagenti devono essere conservati lontano dalla luce, a una temperatura compresa fra -16 °C e -28 °C e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. La garanzia di qualità non è più valida dopo la data di scadenza.
 - Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2–8 °C).
 - Cicli di congelamento e scongelamento ripetuti fino a 8 volte non influenzano le proprietà del test.
- **Tabella 2:** Condizioni di conservazione e informazioni

	Temperatura di conservazione	Tempo massimo di conservazione
prima dell'apertura	da -16 °C a -28 °C	Utilizzabile fino alla data di scadenza indicata
dopo l'apertura	da -16 °C a -28 °C	8 cicli di congelamento e scongelamento

6. Reagenti necessari ma non forniti

Il test di RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time RT-PCR è destinato esclusivamente all'uso con il sistema RIDA[®]UNITY. Per un corretto utilizzo sono indispensabili i seguenti prodotti:

6.1 Reagenti

Per il test RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel sono necessari i seguenti reagenti:

Reagenti	Numero di catalogo
RIDA [®] UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA [®] UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Attrezzatura di laboratorio

Per il test RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel è necessaria la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Sistema RIDA [®] UNITY (R-Biopharm)
Materiali di consumo RIDA [®] UNITY (puntali, piastre, cuvette di reazione, pellicole). Consultare le istruzioni per l'uso del sistema RIDA [®] UNITY, informazioni per l'ordine dei materiali di consumo.
Agitatore a vortice
Centrifuga da tavolo
Guanti monouso senza talco

Il kit RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel può essere utilizzato insieme ad altri ciclatori compatibili. Gli strumenti alternativi per la PCR real-time devono essere verificati/convalidati dall'utente. Contattare R-Biopharm AG all'indirizzo pcr@r-biopharm.de per verificare la compatibilità.

7. Avvertenze e misure precauzionali

Uso per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.

Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.

Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.

Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

Evitare di contaminare i campioni e i componenti del kit con microbi e nucleasi (DNase/RNase).

I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.

Non scambiare o mescolare i componenti (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) di un lotto di un kit con i componenti di un altro lotto.

Il kit di analisi può essere utilizzato entro 4 settimane dalla prima apertura e non deve essere utilizzato dopo la data di scadenza. Queste specifiche sono controllate anche dal sistema RIDA®UNITY.

Gli operatori sono tenuti al corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Ulteriori dettagli sulla scheda di dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) sono disponibili cercando il codice articolo alla pagina

<https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Per gli utenti nell'Unione europea: segnalare tutti gli eventi avversi gravi associati al prodotto a R-Biopharm AG e alle autorità nazionali competenti.

La sintesi sulla sicurezza e le prestazioni (SSP) di questo prodotto sarà disponibile su <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> una volta avviato il database europeo sui dispositivi medici (EUDAMED). Nel database, cercare il dispositivo usando l'UDI-DI che si trova sull'imballaggio esterno del dispositivo.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Per ottenere le migliori prestazioni possibili dal test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel, si raccomanda di utilizzare materiale campione fresco.

Evitare di congelare e scongelare ripetutamente il campione.

Evitare l'uso di terreni di trasporto contenenti conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti o detergenti in quanto queste sostanze potrebbero creare interferenze con i test RIDA®UNITY.

Si raccomanda di produrre aliquote dei campioni per evitare ripetuti scongelamenti e congelamenti. I campioni congelati devono essere scongelati immediatamente prima dell'estrazione per evitare la degradazione degli acidi nucleici.

Seguire le specifiche di conservazione del campione indicate nelle tabelle 3, 4 e 5.

Tabella 3: Conservazione dei campioni - rivelazione di *Campylobacter* spp.
(*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)

Campioni nativi - feci		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 giorni	≤ 7 giorni	≤ 3 mesi / ≤ 6 mesi

In eluato		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

Se la conservazione avviene a -20 °C / -80 °C, il congelamento e scongelamento dell'eluato ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test.

Tabella 4: Conservazione dei campioni - rivelazione di *Salmonella* spp.

Campioni nativi - feci		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
< 1 giorno	≤ 7 giorni	≤ 6 mesi

In eluato		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

Se la conservazione avviene a -20 °C / -80 °C, il congelamento e scongelamento dei campioni / dell'eluato ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test.

Tabella 5: Conservazione del campione - rivelazione di *Yersinia enterocolitica*

Campioni nativi - feci		
20–25 °C	2–8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 7 giorni	≤ 6 mesi

In eluato		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

Se la conservazione avviene a -20 °C / -80 °C, il congelamento e scongelamento dei campioni / dell'eluato ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test.

8.1 Preparazione del DNA da campioni di feci

Per isolare il DNA da campioni fecali, utilizzare il RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (UN0001). Seguire le procedure indicate nelle istruzioni per l'uso del RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (sezione: Preparazione dell'acido nucleico da campioni fecali).

9. Esecuzione del test

All'inizio dell'utilizzo, posizionare sia i campioni sia i reagenti del kit RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel sul sistema RIDA®UNITY.

Prima di procedere, mescolare adeguatamente **Reaction Mix**, **Negative Control** e **Positive Control** utilizzando un agitatore a vortice. Non agitare l'**Enzyme Mix**. Successivamente, centrifugare brevemente tutti i componenti.

Le provette PCR per i campioni da esaminare devono essere posizionate preventivamente nel ciclatore PCR integrato.

Per caricare correttamente il sistema con i reagenti e i materiali di consumo sono disponibili dei supporti. Per il processo di caricamento, seguire le istruzioni del sistema RIDA®UNITY. Osservare le sezioni pertinenti del manuale del sistema RIDA®UNITY (sezione: Esecuzione di un ciclo).

Il test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel può essere utilizzato solo in combinazione con il RIDA®UNITY Internal Control Kit. Questo consente di riconoscere tempestivamente la potenziale inibizione della PCR, di verificare l'integrità del reagente e di confermare l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. La procedura è descritta nelle istruzioni per l'uso del RIDA®UNITY Internal Control Kit (sezione: Esecuzione del test).

La processazione automatizzata è descritta nel manuale del sistema RIDA®UNITY (sezione: Esecuzione di un ciclo).

9.1 Impostazioni del dispositivo

9.1.1 Profilo per PCR real-time universale

Per armonizzare i test RIDA®UNITY, il test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel è stato verificato esclusivamente nel profilo universale. Questo rende possibile combinare tra loro i test del DNA e dell'RNA. In generale, quindi, la trascrizione inversa è il primo passaggio del profilo universale.

Tabella 6: Profilo universale di PCR real-time per RIDA®UNITY

<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	Durata di conservazione

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

9.2 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 7: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento di PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Nota
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	Canale SEEK Sal
	Internal Control	HEX	Canale SEEK ICD
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	Canale SEEK Yers
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	Canale SEEK Campy

10. Controllo qualità – indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

I campioni vengono valutati con il software di analisi RIDA®SEEK del sistema RIDA®UNITY. Perché l'esecuzione sia valida, **Negative Control** e **Positive Control** devono mostrare i risultati corretti (vedere Tabella 8).

Il **Positive Control** è presente a una concentrazione di 10^3 copie/ μ L. Viene utilizzato in una quantità totale di 5×10^3 copie in ogni ciclo di PCR.

Il **Negative Control** contiene già il RIDA®UNITY Internal Control. Poiché i controlli non contengono un modello, non devono essere previsti segnali nei canali target. È indispensabile la presenza di segnali positivi nel canale IC con cui viene rivelato il controllo interno (vedi Tabella 8).

Tabella 8: Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	Risultato	Ct IC	Ct gene target
Controllo positivo	+	non disponibile *	Vedere il Certificate of Analysis
Controllo negativo	-	Ct > 20	0

* Un valore Ct per l'IC non è essenziale per ottenere un risultato positivo per il controllo positivo.

Se il controllo positivo non rientra nell'intervallo Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, tutte le reazioni, compresi i controlli, devono essere rianalizzate nella PCR.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, tutte le reazioni, compresi i controlli, devono essere rianalizzate nella PCR.

Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare quanto segue:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata
- Correttezza della procedura di esecuzione del test

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo aver ripetuto il test, rivolgersi al fabbricante o al proprio distributore R-Biopharm locale.

11. Interpretazione del risultato

La valutazione e l'interpretazione del campione avvengono utilizzando RIDA®SEEK, il software di analisi del sistema RIDA®UNITY.

Al momento non esiste un metodo di riferimento riconosciuto a livello internazionale o un materiale di riferimento per la standardizzazione. La riferibilità metrologica dei materiali di controllo si avvale degli standard interni di R-Biopharm AG sulla base di specifici ampliconi di DNA.

Per ulteriori informazioni sulla riferibilità metrologica contattare R-Biopharm AG.

Per conoscere i valori specificati, gli intervalli e ulteriori dettagli consultare il certificato di analisi (Certificate of Analysis, CoA).

Tabella 9: Interpretazione del risultato*

Rivelazione				
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	IC	Risultato
+	-	-	+/-	<i>Salmonella</i> spp. rivelabile
-	+	-	+/-	<i>Yersinia enterocolitica</i> rivelabile
-	-	+	+/-	<i>Campylobacter</i> spp. rivelabile
+	+	-	+/-	<i>Salmonella</i> spp. e <i>Yersinia enterocolitica</i> rivelabili
+	-	+	+/-	<i>Salmonella</i> spp. e <i>Campylobacter</i> spp. rivelabili
-	+	+	+/-	<i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Campylobacter</i> spp. rivelabili
+	+	+	+/-	<i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Campylobacter</i> spp. rivelabili
-	-	-	+	Geni target non rivelabili
-	-	-	-	Non valido

* + = positivo
- = negativo

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

Un campione è positivo anche se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma non è presente nessun segnale di amplificazione per l'**Internal Control** nel sistema di rivelazione. In questo caso non è necessario rivelare l'**Internal Control** perché elevate concentrazioni dell'amplicone possono rendere debole o assente il segnale dell'**Internal Control**.

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

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'Internal Control mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene inibitori della PCR o si è verificato un errore durante il processo di estrazione.

12. Limiti del metodo

1. Il test RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel rivela il DNA di *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* in campioni fecali umani non trattati. Pertanto, non è possibile dedurre una correlazione tra il livello di un determinato valore Ct e la presenza di sintomi clinici gravi. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
2. La diagnosi non dovrebbe basarsi solo sul risultato del test biologico molecolare, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
3. Questo test è approvato solo per la processazione automatizzata con il sistema RIDA[®]UNITY.
4. Questo test è verificato solo per campioni fecali.
5. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento o un carico di patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
6. La presenza di inibitori della PCR può portare a risultati falsi negativi o non validi.
7. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, concentrazioni delle sequenze target sotto il limite di rivelabilità (LoD 95%) possono comunque essere rivelate, ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
8. Eventuali mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono produrre risultati falsi negativi utilizzando RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel.
9. Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza dei geni target (*Salmonella* spp. (ttr), *Yersinia enterocolitica* (ystA/ystB), *Campylobacter* spp. (16S rDNA, solo *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)).
10. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulle buone pratiche di laboratorio (BPL). Durante l'esecuzione del test, gli operatori devono seguire esattamente le istruzioni del fabbricante.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Prestazioni e caratteristiche cliniche

Il test di RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR è stato confrontato in un laboratorio esterno con un test di riferimento con marchio CE. 405 campioni di feci da pazienti con sintomi clinici di un'infezione gastrointestinale, confermati in precedenza positivi o negativi per *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*, sono stati analizzati utilizzando il test RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel e il test di riferimento con marchio CE.

I risultati dei singoli patogeni sono mostrati nelle Tabelle da 10 a 12:

Tabella 10: Rivelazione di *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)

		PCR di riferimento		Totale
		Positivo	Negativo	
RIDA [®] UNITY Bacterial Stool Panel - <i>Campylobacter</i> spp. (<i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. jejuni</i>)	Positivo	118	0	118
	Negativo	11	276	287
	Totale	129	276	405

Sensibilità relativa (IC 95%)	91,5% (85,3%–95,7%)
Specificità relativa (IC 95%)	100% (98,7%–100%)

Tabella 11: Rivelazione di *Salmonella* spp.

		PCR di riferimento		Totale
		Positivo	Negativo	
RIDA [®] UNITY Bacterial Stool Panel - <i>Salmonella</i> spp.	Positivo	118	1	119
	Negativo	18	268	286
	Totale	136	269	405

Sensibilità relativa (IC 95%)	86,8% (79,9%–92,0%)
Specificità relativa (IC 95%)	99,6% (97,9%–100%)

Tabella 12: Rivelazione di *Yersinia enterocolitica*

		PCR di riferimento		Totale
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel - <i>Yersinia enterocolitica</i>	Positivo	94	0	94
	Negativo	8	303	311
	Totale	102	303	405

Sensibilità relativa (IC 95%)	92,2% (85,1%–96,6%)
Specificità relativa (IC 95%)	100% (98,8%–100%)

13.2 Prestazioni e caratteristiche analitiche

13.2.1 Limite di rivelabilità (LoD 95%)

Un campione di controllo positivo (campioni fecali negativi arricchiti) è stato misurato in cinque fasi di diluizione (in fasi di 0,25-log) per ogni target e matrice con 20 replicati per fase in un lotto per determinare il LoD. Ha fatto seguito un'analisi probit. Successivamente, il LoD calcolato è stato confermato con 20 replicati per target e matrice per la fase/concentrazione di diluizione calcolata.

Per i test sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

Salmonella typhimurium: ATCC® 14028™

Yersinia enterocolitica: DSM 13030

Campylobacter jejuni: ATCC® 33291™

Campylobacter coli: ATCC® 43478™

Campylobacter lari: DSM 11375

Per la rivelazione del DNA di *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* con il test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel, sono stati identificati i seguenti limiti di rivelabilità (LoD) sul sistema RIDA®UNITY.

I risultati di queste misurazioni sono mostrati nella Tabella 13.

Tabella 13: Risultati del limite di rivelabilità del test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel per i parametri *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp., e *Yersinia enterocolitica*.

	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
LoD	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Campylobacter coli</i>: 14.028 CFU*/mL • <i>Campylobacter jejuni</i>: 8.128 CFU*/mL • <i>Campylobacter lari</i>: 2.762 CFU*/mL 	144.212 CFU/mL	102.565 CFU/mL

*CFU: Colony Forming Units

Il LoD per il parametro *Campylobacter coli* nei campioni di feci è stato determinato a 14.028 CFU/mL.

Il LoD per il parametro *Campylobacter jejuni* nei campioni di feci è stato determinato a 8.128 CFU/mL.

Il LoD per il parametro *Campylobacter lari* nei campioni di feci è stato determinato a 2.762 CFU/mL.

Il LoD per il parametro *Salmonella* spp. nei campioni di feci è stato determinato a 144.212 CFU/mL.

Il LoD per il parametro *Yersinia enterocolitica* nei campioni fecali è stato determinato a 102.565 CFU/mL.

13.2.2 Specificità analitica

Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della RT-PCR e sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Quindi, sono stati studiati gli effetti di diverse sostanze che potrebbero essere presenti perché ampiamente utilizzate nelle infezioni gastrointestinali o a causa della loro presenza diffusa nei campioni corrispondenti. Le sostanze che potrebbero influenzare significativamente i risultati del test sono state prima esaminate in un'analisi di interferenza. Inizialmente sono state esaminate varie sostanze che potrebbero essere presenti come residui dell'estrazione, a causa dell'uso diffuso nelle infezioni gastrointestinali (vari farmaci da banco o soggetti a prescrizione), oppure a causa della presenza diffusa nei campioni di controllo corrispondenti (ad es. mucine sulla superficie delle mucose o sangue), in concentrazioni elevate (tre volte la dose giornaliera o la simulazione del caso peggiore).

Non sono state individuate interferenze per le sostanze elencate nella Tabella 14.

Tabella 14: Sostanze potenzialmente interferenti

Sostanza potenzialmente interferente	Concentrazione
Mucine	5% (v/v)
Sangue umano/emoglobina	5% (v/v)
Stearina/acido palmitico	40% (v/v)
Azithromycin-ratiopharm® compresse rivestite con film da 500 mg (azitromicina)	84 mg/mL (p/v)
Compresse di carbone	6,0% [p/v]
Etanolo	5% in base all'eluato
Guanidinio cloridrato	5% in base all'eluato

Reattività crociata

Sono stati studiati vari organismi (batteri, parassiti, funghi e virus) comunemente presenti nella matrice fecale. I microrganismi da studiare per questo test sono stati scelti perché si trovano naturalmente nei campioni di feci o causano sintomi corrispondenti ai patogeni gastrointestinali. Per le analisi sono stati utilizzati colture di batteri (tra 10⁶ e 10⁹ CFU/mL) o funghi, surnatanti di colture virali, isolati o standard LGS per gli organismi indicati.

Il test di RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR è specifico per *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*. Non sono state rivelate reattività crociate con le seguenti sostanze (vedere Tabella 15):

Tabella 15: Organismi potenzialmente cross-reattivi

Organismo	Risultato del test*		
	<i>Campylobacter</i> spp. (<i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. jejuni</i>)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	-	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Astrovirus Tipo 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-	-
<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	-	-

<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i> HK-9	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Giardia lamblia</i>	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GI	-	-	-
Norovirus GII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus, ceppo Wa	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-

* - = negativo

13.2.4 Precisione

La precisione del test di RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel real-time PCR è stata determinata per i seguenti livelli di valutazione.

Precisione *intra*-test: determinazione di 5 campioni di controllo con 20 replicati ciascuno su RIDA®UNITY in condizioni identiche.

Precisione *inter*-test: determinazione di 5 campioni di controllo in 20 esecuzioni in duplicato in 10 giorni (2 esecuzioni al giorno) eseguite da tecnici diversi in condizioni riproducibili.

I test di precisione *intra*-test e *inter*-test sono stati condotti utilizzando tre diversi lotti.

I dati di precisione sono stati ottenuti utilizzando cinque campioni di controllo, nonché il PTC e l'NTC appartenenti al test.

I coefficienti di variazione ottenuti per ogni misurazione utilizzando il test di PCR real-time RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel su RIDA®UNITY sono stati inferiori al 4,19%.

Tabella 16: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel per *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*).

Ct	Valore medio /CV	<i>Intra</i> -test			<i>Inter</i> -test			<i>Inter</i> -lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	24,31	25,0	24,3	23,4	23,4	24,3	23,4
	CV (%)	0,95	0,43	0,35	1,86	1,81	1,90	1,86
2	Ct	31,3	31,2	31,4	27,9	27,9	27,9	27,9
	CV (%)	0,77	0,59	0,74	4,19	3,82	3,84	3,96
3	Ct	30,8	30,6	30,5	30,4	30,1	30,2	30,3
	CV (%)	0,49	0,67	0,84	1,73	2,44	1,73	2,00
4	Ct	29,0	28,9	29,3	29,1	28,9	29,0	29,0
	CV (%)	0,41	0,30	0,80	3,08	2,99	3,01	3,03
5	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile

Tabella 17: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel per *Salmonella* spp.

Ct	Valore medio /CV	Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	23,6	23,7	23,7	23,6	23,7	23,6	23,7
	CV (%)	0,86	0,41	0,39	1,34	1,32	1,44	1,37
2	Ct	30,4	30,4	30,4	27,0	26,9	27,0	27,0
	CV (%)	0,71	0,58	0,74	1,31	1,24	1,29	1,27
3	Ct	30,3	30,3	30,1	30,2	30,2	30,2	30,2
	CV (%)	0,38	0,65	0,74	1,02	1,03	1,20	1,09
4	Ct	27,3	27,2	27,3	27,9	27,8	27,8	27,9
	CV (%)	0,54	0,54	0,60	1,30	1,22	1,21	1,24
5	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile

Tabella 18: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel per *Yersinia enterocolitica*.

Ct	Valore medio /CV	Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	25,1	26,1	25,2	24,4	24,4	24,4	24,4
	CV (%)	0,84	0,36	0,58	1,61	1,61	1,70	1,64
2	Ct	32,6	32,5	32,4	28,6	28,5	28,4	28,5
	CV (%)	1,63	1,15	1,31	1,51	1,45	1,78	1,58
3	Ct	31,9	31,8	31,8	31,5	31,4	31,4	31,4
	CV (%)	0,81	0,91	1,08	1,60	1,58	1,45	1,54
4	Ct	29,1	29,0	29,2	29,7	29,6	29,7	29,7
	CV (%)	0,63	0,54	0,59	2,22	2,22	2,19	2,21
5	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile

13.2.5 Reattività analitica

La reattività del test di RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR è stata testata su più sierotipi di *Salmonella*, specie di *Campylobacter* e sottospecie di *Yersinia enterocolitica* (vedere Tabella 19).

Tabella 19: Test di reattività analitica

Ceppo	Concentrazione	Risultato*		
		<i>Campylobacter</i> spp. (<i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. jejuni</i>)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Campylobacter coli</i>	6,5 x 10 ² CFU/mL	+	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	1,5 x 10 ³ CFU/mL	+	-	-
<i>Campylobacter lari</i> ssp. <i>lari</i>	1,04 x 10 ² CFU/mL	+	-	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Typhi</i>	1,49 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Typhimurium</i>	7,7 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Enteritidis</i>	3,3 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Paratyphi A</i>	1,75 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Paratyphi B</i>	2,08 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Paratyphi C</i>	1,1 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Newport</i>	3,1 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Heidelberg</i>	5,9 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Javiana</i>	1,79 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Dublin</i>	2,88 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Agona</i>	1,91 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Choleraesuis</i>	9,6 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Infantis</i>	1,3 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Montevideo</i>	8,4 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-

<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Anatum</i>	2,38 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Mississippi</i>	2,27 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo <i>Bareilly</i>	1,43 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i>	4,2 x 10 ³ CFU/mL	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>palaearctica</i>	4,9 x 10 ³ CFU/mL	-	-	+

* + = positivo (almeno 2 replicati su 3 positivi)










- = negativo

14. Cronologia delle versioni


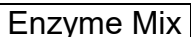
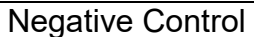
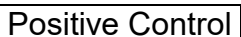
Numero della versione	Sezione e denominazione
2022-04-28	Versione di rilascio

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Fabbricante

Simboli specifici del test

	Miscela di reazione
	Miscela enzimatica
	Controllo negativo
	Controllo positivo

16. Bibliografia

1. World Health Organisation. Diarrhoeal disease 2017, May 2 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease#:~:text=Infection%3A%20Diarrhoea%20is%20a%20symptom%20of%20infections%20caused,and%20safe%20water%20for%20drinking%2C%20cooking%20and%20cleaning.>] 2021-09-07
2. Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(5).
3. Costa D, Iraola G. Pathogenomics of Emerging Campylobacter Species. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(4).
4. Centers for Disease Control and Prevention. Campylobacter (Campylobacteriosis) 2021 [Available from: <https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html>.] 2021-09-07
5. Institut RK. Campylobacter-Enteritis 2018 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Campylobacter.html.] 2021-09-07
6. Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella 2019 [Available from: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>.]
7. Robert Koch Institut. Salmonellose 2016 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Salmonellose.html.] 2021-09-07
8. Robert Koch Institut. Typhus abdominalis, Paratyphus. 2015.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Yersinia enterocolitica (Yersiniosis) 2016 [Available from: <https://www.cdc.gov/yersinia/index.html>.] 2021-09-07
10. Rosner BM, Stark K, Werber D. Epidemiology of reported Yersinia enterocolitica infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health*. 2010;10(1):337.
11. Robert Koch Institut. Yersiniose 2019 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Yersiniose.html.] 2021-09-07