

## RIDA® UNITY Parasitic Stool Panel II

**REF** UN1725



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](http://www.r-biopharm.com)



0123

## 1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II, eseguito su piattaforma RIDA® UNITY, è un test di PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta del DNA di *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* in campioni di feci umane non trattate di soggetti con segni e sintomi di infezione gastrointestinale.

Il test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II ha lo scopo di supportare la diagnosi di infezioni parassitarie (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica*) in pazienti con sintomi di infezione gastrointestinale, in correlazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono un'infezione parassitaria (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica*) e non dovrebbero essere usati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* sono i principali protozoi che causano diarrea.

Nel mondo *Giardia lamblia*, conosciuta anche come *G. intestinalis* o *G. duodenalis*, causa malattie diarroiche altrimenti note come giardiasi. Ogni anno sono segnalati circa 500.000 nuovi casi<sup>(1)</sup>. La prevalenza della giardiasi varia dal 2% al 7% nei Paesi industrializzati e dal 20% al 30% nei Paesi in via di sviluppo<sup>(2)</sup>. L'infezione avviene attraverso l'ingestione di acqua o cibo contaminati da oocisti o attraverso la via oro-fecale. La giardiasi acuta si sviluppa dopo un periodo di incubazione compreso fra 15 e 30 giorni e di solito dura da 1 a 3 settimane. I sintomi dell'infezione acuta sono diarrea con feci pastose e maleodoranti, dolore addominale, flatulenza, nausea e vomito. Esistono, tuttavia, anche casi cronici e persino portatori asintomatici<sup>(3)</sup>.

*Cryptosporidium parvum* è una delle numerose specie del genere *Cryptosporidium*. *C. parvum* e *C. hominis* sono alcune delle cause più comuni di criptosporidiosi nell'uomo e sono responsabili di oltre un milione di morti all'anno. Tuttavia, anche le infezioni causate da altri *Cryptosporidium* spp. come *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. muris* possono portare a sintomi clinici<sup>(4)</sup>. Nel periodo dal 2009 al 2017 negli Stati Uniti sono stati segnalati 444 focolai di criptosporidiosi che hanno causato 7465 casi, 287 ricoveri e 1 decesso<sup>(5)</sup>. L'infezione avviene principalmente attraverso l'ingestione di acqua e cibo contaminati da oocisti contenenti sporozoi e attraverso la trasmissione oro-fecale da uomo a uomo. La criptosporidiosi può essere asintomatica o provocare sintomi che arrivano alla diarrea acquosa grave, oltre a dolore addominale, nausea e febbre. La dose di infezione alla quale il 50% delle persone esposte viene infettato è bassa, pari a 10-1.000 oocisti. Nei soggetti immunocompetenti i sintomi durano in totale circa 1 o 2 settimane. I soggetti immunocompromessi, come i pazienti HIV, possono sviluppare forme di criptosporidiosi molto più gravi, lunghe e potenzialmente pericolose per la vita<sup>(4)</sup>. In

questi casi il decorso della malattia dipende dal grado di indebolimento del sistema immunitario<sup>(6,7)</sup>.

*Entamoeba histolytica* è l'unica specie del genere *Entamoeba* patogena per l'uomo e causa infezioni del tratto gastrointestinale note anche come amebiasi. L'infezione avviene per via oro-fecale attraverso l'ingestione di acqua e cibo contaminati da cisti, ma può anche essere diffusa da uomo a uomo<sup>(8, 9)</sup>. Ogni anno si verificano circa 50 milioni di infezioni che provocano da 40.000 a 110.000 morti<sup>(8)</sup>. Circa il 90% delle infezioni sono asintomatiche. Nei casi sintomatici, i sintomi possono svilupparsi entro 2-4 settimane e comprendono diarrea, dolore addominale, febbre e anche manifestazioni gravi come il granuloma amebico (ameboma), ovvero una massa che viene a formarsi nel colon<sup>(9)</sup>.

### 3. Principio del test

Il test RIDA<sup>®</sup>UNITY Parasitic Stool Panel II è un test di PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione del DNA di *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* in campioni fecali umani.

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

La sequenza target viene sempre rivelata mediante RT-PCR real-time a singola fase (anche con i test del DNA), ovvero la trascrizione inversa (RT) e la successiva PCR avvengono nella medesima cuvetta di reazione. Nel processo, l'RNA isolato (se presente) viene trascritto in cDNA con l'ausilio di una trascrittasi inversa. I frammenti di geni specifici per *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. e *Entamoeba histolytica* (ITS1-18S) vengono quindi amplificati mediante PCR real-time.

Le sequenze target amplificate 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, il RIDA<sup>®</sup>UNITY Internal Control Kit verifica 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

RIF	Reagente	Quantità		Colore del tappo
UNZ1725RM	Reaction Mix	1 x	1935 µL	giallo, pronto per l'uso
UNZ1725EM	Enzyme Mix	1 x	350 µL	rosso, pronto per l'uso
UNZ1725PC	Positive Control	1 x	200 µL	blu, pronto per l'uso
UNZ1725NC	Negative Control	1 x	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 °C-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 RT-PCR real-time multiplex RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II 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 Parasitic Stool Panel II 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 Parasitic Stool Panel II è necessaria la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Sistema RIDA®UNITY; numero di catalogo: ZUNITY (R-Biopharm AG)
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
Ciclatore esterno (possibile potenziamento del sistema)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Il kit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II 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](mailto: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 (DNasi/RNasi).

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 test può essere utilizzato per 8 settimane dalla prima apertura (può essere ricaricato fino a 6 volte). Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Queste specifiche sono controllate anche dal sistema RIDA<sup>®</sup>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.

## 8. Raccolta e conservazione dei campioni

Per ottenere le migliori prestazioni dal test RIDA<sup>®</sup>UNITY Parasitic Stool Panel II 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<sup>®</sup>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 istruzioni per la conservazione dei campioni nelle Tabelle 3-5.

**Tabella 3:** Conservazione dei campioni - rivelazione di *Giardia lamblia*

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

  

In eluato		
30 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

Se la conservazione avviene a -20 °C / -80 °C, il congelamento e scongelamento dei campioni ripetuto per un massimo di 5 volte non influisce sulle proprietà del test.

Se la conservazione avviene a -20 °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 *Entamoeba histolytica*

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

In eluato		
30 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

Se la conservazione avviene a -80 °C, il congelamento e scongelamento del campione ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test. Per questi analiti è opportuno evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni a -20 °C.

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

**Tabella 5:** Conservazione dei campioni - rivelazione di *Cryptosporidium spp.*

Campioni nativi - feci			
20 °C-25 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C	-80 °C
< 1 giorno	≤ 7 giorni	≤ 3 mesi	≤ 6 mesi

In eluato		
30 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C
≤ 24 ore	≤ 36 ore	≤ 7 giorni

L'analita *Cryptosporidium spp.* è stabile dopo ripetuti cicli di congelamento e scongelamento del campione di feci: a -80 °C per cinque cicli e a -20 °C per tre cicli. Se la conservazione avviene a -20 °C, il congelamento e scongelamento 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 dai campioni di feci, utilizzare il RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Seguire le procedure indicate nelle istruzioni per l'uso del RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (sezione: Preparazione dell'acido nucleico da campioni fecali; sezione: Preparazione dell'acido nucleico da campioni di coltura).

## 9. Esecuzione del test

All'inizio dell'utilizzo, posizionare sia i campioni sia i reagenti del kit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II 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 Parasitic Stool Panel II 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 PCR real-time universale

Per armonizzare i test RIDA®UNITY, il test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II è stato verificato 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	Massima

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

**Tabella 7:** Profilo di PCR real-time universale per CFX96™ Dx

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

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

## 9.2 Impostazione del canale di rivelazione

**Tabella 8:** Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Nota
<b>R-Biopharm RIDA®UNITY</b>	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	Canale SEEK Giardia
	Internal Control	HEX	Canale SEEK ICD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	Canale SEEK Enta
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	Canale SEEK Crypto
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	Canale SEEK Giardia
	Internal Control	VIC	Canale SEEK ICD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	Canale SEEK Enta
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	Canale SEEK Crypto

## 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 9).

Il **Positive Control** è presente a una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu$ L. Viene utilizzato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  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 (vedere Tabella 9).

**Tabella 9:** 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

\* In alcune circostanze, il canale IC può avere un segnale positivo nel controllo positivo e quindi non deve essere valutato.

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. Valutazione e interpretazione

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

Non esiste un metodo di riferimento o un materiale di riferimento attualmente riconosciuto a livello internazionale per la standardizzazione. La riferibilità metrologica dei materiali di controllo si avvale degli standard interni di R-Biopharm AG basati su 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 Certificate of Analysis (CoA).

**Tabella 10:** Interpretazione del risultato \*

Rivelazione di				
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium spp.</i>	ICD	Risultato
+	-	-	+/-	<b><i>Giardia lamblia</i> rivelabile</b>
-	+	-	+/-	<b><i>Entamoeba histolytica</i> rivelabile</b>
-	-	+	+/-	<b><i>Cryptosporidium spp.</i> rivelabile</b>
+	+	-	+/-	<b><i>Giardia lamblia, Entamoeba histolytica</i> rivelabili</b>
+	-	+	+/-	<b><i>Giardia lamblia, Cryptosporidium spp.</i> rivelabili</b>
-	+	+	+/-	<b><i>Entamoeba histolytica, Cryptosporidium spp.</i> rivelabili</b>
+	+	+	+/-	<b><i>Giardia lamblia, Entamoeba histolytica e Cryptosporidium spp.</i> rivelabili</b>
-	-	-	+	<b>Geni target non rivelabili</b>
-	-	-	-	<b>Non valido</b>

\*+ = 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 e una precedente estrazione.

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 o si è verificato un errore durante il processo di estrazione.

## 12. Limiti del metodo

1. Il test RIDA<sup>®</sup>UNITY Parasitic Stool Panel II rivela il DNA di *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. ed *Entamoeba histolytica* in campioni di feci umane non trattate. 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<sup>®</sup>UNITY.
4. Questo test è verificato solo per campioni fecali.
5. Quando si utilizza la matrice di coltura, non trasferire il terreno di coltura di agar nella reazione PCR perché questo può causare potenziali interferenze.
6. Campionamento, trasporto, conservazione e manipolazione impropri o un carico di patogeni inferiore alla sensibilità analitica del test possono portare a risultati falsi negativi.
7. La presenza di inibitori della PCR può portare a risultati falsi negativi o non validi.
8. 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.
9. Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono portare a risultati falsi negativi con RIDA<sup>®</sup>UNITY Parasitic Stool Panel II.
10. Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un test positivo indica la presenza di frammenti di geni specifici per *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. e *Entamoeba histolytica* (ITS1-18S).
11. 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 PCR real-time multiplex RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II è stato confrontato in un laboratorio esterno con un test di riferimento con marcatura CE sulla base di 278 campioni fecali di pazienti con sintomi di infezione gastrointestinale.

I risultati mostrano un'elevata sensibilità e specificità nella rivelazione di *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium spp.* utilizzando il kit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II.

**Tabella 11:** Rivelazione di *Giardia lamblia*

		PCR di riferimento		Totale
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II- <i>Giardia lamblia</i>	Positivo	77	1	78
	Negativo	8	192	200
	Totale	85	193	278

Sensibilità relativa (IC 95%)	90,6% (82,3%-95,8%)
Specificità relativa (IC 95%)	99,5% (97,1%-100%)

**Tabella 12:** Rivelazione di *Entamoeba histolytica*

		PCR di riferimento		Totale
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II- <i>Entamoeba histolytica</i>	Positivo	70	1	71
	Negativo	7	200	207
	Totale	77	201	278

Sensibilità relativa (IC 95%)	90,9% (82,2%-96,3%)
Specificità relativa (IC 95%)	99,5% (97,3%-100%)

**Tabella 13:** Rivelazione di *Cryptosporidium spp.*

		PCR di riferimento		Totale
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II- <i>Cryptosporidium spp.</i>	Positivo	74	1	75
	Negativo	1	202	203
	Totale	75	203	278

Sensibilità relativa (IC 95%)	98,7% (92,8%-100%)
Specificità relativa (IC 95%)	99,5% (97,3%-100%)

## 13.2 Prestazioni e caratteristiche analitiche

### 13.2.1 Limite di rivelabilità (LoD 95%)

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

Per i test sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

- *Cryptosporidium* spp. da campioni clinici di feci positivi in pool (MF171865 e MF172060); concentrazione iniziale non nota; intervallo Ct 24-25
- *Giardia lamblia* da campioni clinici di feci positivi in pool (34544905 e 34504696); concentrazione iniziale non nota; intervallo Ct 29-30
- *Entamoeba histolytica* CF (ATCC® 30015™); concentrazione iniziale 2,7 x 10<sup>6</sup> cellule/mL

I seguenti limiti di rivelabilità sono stati determinati per la rivelazione di DNA di *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* utilizzando il test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II sul sistema UNITY.

I risultati di queste misurazioni sono mostrati nella Tabella 14.

**Tabella 14:** Risultati del limite di rivelabilità del test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II per i parametri *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* ed *Entamoeba histolytica*.

	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
LoD	fattore di diluizione** 1,68E-2 (Ct 35,34 ± 0,72)	9,53 cellule/mL	fattore di diluizione* 1,98E-2 (Ct 36,18 ± 2,05)

\* Diluizione relativa della concentrazione madre. Campione clinicamente positivo con concentrazione iniziale Ct 24-25

\*\* Diluizione relativa della concentrazione madre. Campione clinicamente positivo con concentrazione iniziale Ct 29-30

Il LoD per *Giardia lamblia* nei campioni di feci è stato determinato a un fattore di diluizione di 1,68E-2.

Il LoD per *Entamoeba histolytica* nei campioni di feci è stato determinato a 9,53 cellule/mL.

Il LoD per *Cryptosporidium* spp nei campioni di feci è stato determinato a un fattore di diluizione di 1,98E-2.

Per il flusso di lavoro migliorato con CFX96™ Dx, questi valori di LoD sono stati confermati nell'ipotesi di rimanere in un intervallo di LoD di 2-3 volte.

### 13.2.2 Specificità analitica

#### Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della PCR e di 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 in modo significativo i risultati del test sono state esaminate inizialmente ad alte concentrazioni (il triplo della dose giornaliera o la simulazione del caso peggiore) in un'analisi di interferenza. Non sono state individuate interferenze per le sostanze elencate nella Tabella 15.

**Tabella 15:** Sostanze potenzialmente interferenti

Sostanza potenzialmente interferente	Concentrazione
Azithromycin-ratiopharm® compresse rivestite con film da 500 mg (azitromicina)	0,75% [p/v]
Cologran® dolcificante liquido (saccarina + ciclamato)	1,3% [p/v]
Sangue umano	5% [v/v]
Compresse di carbone 250 mg (carbone)	6% [p/v]
Mucine	5% [p/v]
Stearina/acido palmitico	40% [p/v]

## Reazioni crociate

Sono stati studiati vari organismi (batteri, parassiti, funghi e virus) che si possono trovare comunemente 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 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> CFU/mL), colture di funghi o virus, surnatanti di colture virali, isolati e standard LGC dei rispettivi organismi.

Il test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>UNITY Parasitic Stool Panel II è specifico per *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* ed *Entamoeba histolytica*.

Non sono state rivelate reattività crociate con le seguenti specie (vedere Tabella 16):

**Tabella 16:** Organismi potenzialmente cross-reattivi

Organismo	Risultato del test *		
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium spp.</i>
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	-	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	-	-
Astrovirus	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</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>	-	-	-
Coxsackievirus B4	-	-	-
<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	-	-

<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
Echovirus Tipo 11	-	-	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
Enterovirus tipo 71	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GI	-	-	-
Norovirus GII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-

\* - = negativo

### 13.2.3 Precisione

La precisione del test di PCR real-time RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II 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 coefficienti di variazione ottenuti per ogni misurazione con il test di PCR real-time RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II su RIDA®UNITY e su CFX96™ Dx sono stati del 5,06%.

**Tabella 17:** Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II per *Giardia lamblia* da campioni di feci (sistema RIDA®UNITY).

Valore medio Ct / CV		<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno
2	Ct	34,3	34,5	34,0	35,0	34,8	35,2	35,0
	CV (%)	2,40%	1,73%	1,60%	2,38%	2,22%	2,23%	2,31%
3	Ct	34,9	35,2	34,2	35,5	35,2	35,3	35,3
	CV (%)	2,14%	1,88%	2,28%	3,05%	2,29%	2,50%	2,63%
4	Ct	33,1	33,4	33,2	33,0	33,0	33,0	33,0
	CV (%)	1,67%	1,60%	1,45%	1,96%	1,93%	2,01%	1,97%
5	Ct	33,3	33,7	33,6	33,8	33,6	33,6	33,0
	CV (%)	1,73%	1,74%	1,46%	1,82%	1,91%	1,81%	1,97%

**Tabella 18:** Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II per *Giardia lamblia* da campioni di feci (CFX96™ Dx)

Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno
2	Ct	35,0	35,5	34,9	35,3	35,1	35,2
	CV (%)	2,76%	1,86%	2,51%	1,97%	2,26%	2,27%
3	Ct	35,8	35,8	35,3	35,5	35,3	35,2
	CV (%)	2,83%	2,52%	2,32%	2,56%	2,41%	2,57%
4	Ct	33,2	33,2	33,3	32,9	32,9	32,8
	CV (%)	2,08%	2,18%	2,16%	2,10%	1,54%	1,64%
5	Ct	34,1	34,7	33,7	33,7	33,6	33,6
	CV (%)	1,81%	1,88%	2,39%	1,77%	1,90%	1,79%

**Tabella 19:** Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II per *Entamoeba histolytica* da campioni di feci (sistema RIDA®UNITY).

Valore medio Ct / 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	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno
2	Ct	31,9	32,2	32,1	34,5	34,3	34,5	34,4
	CV (%)	5,46%	1,30%	1,29%	3,33%	2,86%	3,68%	3,31%
3	Ct	31,5	31,9	30,4	33,6	33,5	33,6	33,6
	CV (%)	2,14%	1,89%	3,16%	2,81%	3,24%	3,53%	3,21%
4	Ct	29,7	30,4	30,0	30,7	30,7	30,8	30,7
	CV (%)	0,85%	0,87%	1,34%	1,94%	1,69%	2,02%	1,89%
5	Ct	31,3	32,8	32,6	31,9	31,8	31,9	31,9
	CV (%)	3,21%	4,73%	2,47%	2,60%	2,23%	2,71%	2,52%

**Tabella 20:** Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II per *Entamoeba histolytica* da campioni di (CFX96™ Dx).

Valore medio Ct / 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	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	Nessuno						
2	Ct	32,4	32,8	32,2	33,9	33,8	33,7	33,8
	CV (%)	2,12%	2,21%	2,12%	2,63%	3,02%	3,00%	2,89%
3	Ct	31,7	31,7	31,3	33,0	32,9	32,7	32,9
	CV (%)	2,02%	1,71%	1,95%	3,16%	2,55%	2,71%	2,82%
4	Ct	30,0	29,6	29,5	30,4	30,5	30,4	30,5
	CV (%)	0,60%	0,76%	0,72%	1,98%	1,63%	1,79%	1,81%
5	Ct	32,6	33,3	32,0	31,3	31,4	31,3	31,3
	CV (%)	2,09%	3,68%	2,23%	2,01%	1,78%	1,58%	1,80%

**Tabella 21:** Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II per *Cryptosporidium* spp. da campioni di feci (sistema RIDA®UNITY).

Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>	
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3	
1	Ct	-	-	-	-	-	-	
	CV (%)	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	
2	Ct	31,5	32,9	33,3	32,0	34,7	34,3	33,7
	CV (%)	2,25%	1,61%	1,41%	1,83%	3,15%	2,74%	5,06%
3	Ct	33,8	35,0	34,4	32,8	35,4	35,0	34,4
	CV (%)	2,92%	2,31%	1,95%	2,42%	3,27%	3,40%	5,03%
4	Ct	27,3	28,1	28,3	26,6	28,8	28,6	28,0
	CV (%)	0,70%	1,15%	0,90%	1,41%	2,86%	2,60%	4,94%
5	Ct	28,5	29,7	29,5	27,2	29,4	29,3	28,6
	CV (%)	0,70%	1,04%	0,94%	1,57%	2,82%	2,47%	4,84%

**Tabella 22:** Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II per *Cryptosporidium* spp. da campioni di feci (CFX96TM Dx)

Valore medio Ct / 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	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	Nessuno						
2	Ct	30,5	32,3	31,8	32,4	34,2	34,3	33,6
	CV (%)	1,81%	2,07%	1,23%	2,93%	2,97%	2,58%	4,16%
3	Ct	31,8	32,9	34,6	33,5	34,6	34,7	34,3
	CV (%)	3,68%	1,53%	1,84%	3,38%	2,90%	2,75%	3,55%
4	Ct	27,0	28,1	28,2	27,2	28,6	28,6	28,1
	CV (%)	0,78%	1,02%	0,93%	2,20%	2,87%	2,21%	3,74%
5	Ct	28,3	29,4	29,4	27,7	29,1	29,0	28,6
	CV (%)	0,83%	0,72%	0,91%	1,64%	2,75%	1,91%	3,59%

### 13.2.4 Reattività analitica

La reattività del test di PCR real-time multiplex RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II è stata esaminata su un gruppo definito di parassiti (vedere Tabella 23).

**Tabella 23:** Test di reattività analitica

Ceppo	Risultato*		
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Giardia lamblia</i> **	+	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** Portland 1	+	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** WB Clone C6	+	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	+	-
<i>Cryptosporidium parvum</i> (isolato)	-	-	+
<i>Cryptosporidium parvum</i> (DNA artificiale)	-	-	+
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	+
<i>Cryptosporidium hominis</i>	-	-	+

\* + = positivo (almeno 2 dei 3 replicati positivi)

- = negativo

\*\* *Giardia intestinalis* e *Giardia lamblia* sono lo stesso organismo.

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2022-09-13	Versione di rilascio

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Usò per la 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. Escobedo AA, Hanevik K, Almirall P, Cimerman S, Alfonso M. Management of chronic Giardia infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(9):1143-57.
2. Dixon B. Giardia duodenalis in humans and animals - Transmission and disease. 2020.
3. Bialek R, Dostal G. Parasitosen, Mykosen, Tropen- und Reisemedizin. *Pädiatrie.* 2019:371-99. German. doi: 10.1007/978-3-662-57295-5\_16. PMID: PMC7498386.
4. Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of Cryptosporidium species. *Acta Trop.* 2018;184:1-14.
5. Dong S, Yang Y, Wang Y, Yang D, Yang Y, Shi Y, et al. Prevalence of Cryptosporidium Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitol.* 2020;65(4):882-9.
6. T. Löscher und G.D. Burchard (Hrsg.): Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin. 4. Aufl., Thieme, Stuttgart; New York, 2010, S. 655-659.
7. Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie (Hrsg.): DGPI Handbuch. Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. 6. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, 2013
8. Salami A, Fakh H, Chakkour M, Salloum L, Bahmad HF, Ghseini G. Prevalence, risk factors and seasonal variations of different Enteropathogens in Lebanese hospitalized children with acute gastroenteritis. *BMC Pediatr.* 2019;19(1):137.
9. Custodio H. Protozoan Parasites. *Pediatr Rev.* 2016;37(2):59-69; quiz 70-1.