

# EasyScreen™

## KIT DI RILEVAMENTO DI BATTERI INTESTINALI

Saggio di amplificazione di DNA in vitro per la determinazione qualitativa di *Salmonella Spp*, *Shigella Spp*, *Campylobacter Spp*, *Yersinia enterocolitica*, toxigenic *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio colera/Vibrio parahaemolyticus* e *Shiga Toxigenic E. coli* in campioni fecali.

**CODICI PRODOTTO:** EB003 (100 test) - EB003-HT (500 test)

**TECNOLOGIA:** Real Time PCR

**PRINCIPIO DEL METODO:** Questo test rileva e amplifica l'acido nucleico che è stato trasformato con il kit di estrazione e purificazione **EasyScreen™**. Aggiungendo del Sodio Bisolfito, tutte le basi di Citosina vengono convertite in Timina per creare il **DNA/RNA 3base™** in una reazione che avviene contemporaneamente alla lisi cellulare (incubazione di 15 min a 95°C). Dopo la purificazione, l'acido nucleico è pronto per essere amplificato nella reazione di PCR Real-Time. Ogni DNA target viene quindi rilevato grazie ad uno specifico fluoroforo (verde, giallo, arancione o rosso); i segnali di fluorescenza vengono misurati dallo strumento Real-Time PCR che fornisce infine il risultato finale.

**CAMPIONI:** Feci liquide o solide oppure campioni in coltura

**MATERIALI FORNITI:**

SET A	SET B	SET C
5 provette PCR mastermix A	5 provette PCR mastermix B	5 provette PCR mastermix C
5 provette PCR componenti A	5 provette PCR componenti B	5 provette PCR componenti C

**MATERIALI NECESSARI  
MA NON FORNITI:**

Termociclatore Real-Time PCR 96 o 384 pozzetti  
Piastrre PCR con pellicole sigillanti  
Pipette manuali singole o multicanali 1-2 µl, 10-1000 µl  
Puntali con filtro 10-1000 µl  
Centrifuga compatibile con le piastrre/provette PCR usate  
Miscelatore a vortice

**STRUMENTAZIONE  
COMPATIBILE:**

Bio-Rad CFX96™ o Bio-Rad CFX384™  
Agilent (Stratagene) Mx3000P/ MX3005P  
Roche Lightcycler 480 (blocco a 96 o a 384 pozzetti)  
Qiagen RotorGene (rotore a 72 pozzetti con provette da 0,1 ml)  
Cepheid SmartCycler II  
ABI 7500 Fast

**RISULTATI:** 150 minuti di amplificazione in Real-Time PCR  
I risultati si ottengono in circa 4 ore

**SINTESI  
DELLA PROCEDURA  
DI ESTRAZIONE  
ED AMPLIFICAZIONE:**

**RACCOLTA DEI CAMPIONI:**

Il Kit di rilevamento dei Batteri intestinali **EasyScreen™** è concepito per funzionare con il DNA utilizzando il kit di estrazione e purificazione del campione **EasyScreen™**

**PREPARAZIONE DEL SAGGIO:**

Trasferire l'intero contenuto della provetta "PCR mastermix A" nella provetta "PCR componenti A" e ripetere l'operazione con le "PCR mastermix" e le "PCR componenti" B e C. Aliquotare ciascuna miscela combinata (A, B e C) nei singoli pozzetti PCR di una piastra PCR ed aggiungere ogni campione eluato in ogni singolo pozzetto

**AMPLIFICAZIONE REAL-TIME PCR:**

Avviare il termociclatore con il seguente programma utilizzando il canale verde (FAM, SYBR®, ecc.), giallo (VIC, HEX, TET, ecc.), arancione (ROX, Texas Red® ecc.) e rosso (Cy5, LightCycler Red640 ecc.)

37°C/5 minuti	x 1 ciclo
42°C/30 minuti	x 1 ciclo
95°C/15 minuti	x 1 ciclo
95°C/2 sec 55°C/30 sec (raccolta dati) 60°C/30 sec 65°C/30 sec	x 50 cicli

**SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ:**

PATOGENO RILEVATO	SENSIBILITÀ %	SPECIFICITÀ %
<i>Clostridium difficile</i>	93.9	99.4
<i>Campylobacter Spp</i>	100	100
<i>Salmonella Spp</i>	97.7	100
<i>Yersinia enterocolitica</i>	100	100
<i>Shigella Spp</i>	100	99.5
<i>Listeria monocytogenes</i>	NA	NA

NA = non disponibile. Test non eseguito di routine

**INTERPRETAZIONE  
DEI RISULTATI:**

Verificare che i controlli IPC e EC diano segnali positivi nei canali gialli. Quindi valutare i risultati ottenuti nel canale verde, arancione e rosso. Se IPC o EC mostrano risultati negativi, vedere la sezione "Risoluzione dei problemi" nel manuale d'uso.

**LETTERATURA:**

1. D. Stark, T. Roberts, D. Marriott, J. Harkness (2014). Evaluation of the **EasyScreen™** Enteric Parasite Detection Kit for the detection of Blastocystis spp., Cryptosporidium spp., Dientamoeba fragilis, Entamoeba complex, and Giardia intestinalis from clinical stool samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease" 78(2): 149-152.
2. S.P Siah, K. Kaur, J. Nair, P. G. Huntington, T. Karagiannis, D. Stark, J. Merif, W. Rawlinson, T. Olma, L. Thomas, J. R. Melki and D. S. Millar (2014). Improved detection of gastrointestinal pathogens using generalised sample processing and amplification panels. Pathology 46(1): 53-59.
3. K. C. Carson, S. P. Siah, D. Millar, B. MacKenzie, J. Melki and T. V. Riley (2014). Evaluation of the **EasyScreen™** C. difficile Detection Kit for tcdA and tcdB. Poster presentation, ECCMID, 2014.
4. L. C. Thomas, T. Olma, S. Chen. **EasyScreen™** multiplexed real-time PCR assays for rapid and cost effective routine detection of faecal pathogens. Proffered paper/Oral presentation, The Australian Society for Microbiology, Annual scientific meeting (2013).