

EasyScreen™

KIT DI RILEVAMENTO DI *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Saggio di amplificazione di DNA in vitro per la determinazione qualitativa di *Clostridium difficile* (*tdcA* e *tdcB*) in campioni fecali.

CODICI PRODOTTO: CDD001 (100 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: 5 provette PCR mastermix
5 provette PCR componenti

**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: 120 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 del *C. difficile* **EasyScreen™** è concepito per funzionare con il DNA/RNA utilizzando il kit di estrazione e purificazione del campione **EasyScreen™**.

PREPARAZIONE DEL SAGGIO:

Trasferire l'intero contenuto della provetta "PCR mastermix" nella provetta "PCR componenti". Aliquotare la miscela combinata 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.) 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

**INTERPRETAZIONE
DEI RISULTATI:**

Verificare che i controlli IPC e EC diano segnali positivi nel canale giallo e rosso. Quindi valutare il risultato ottenuto nel canale verde. 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).