

EasyScreen™

KIT DI RILEVAMENTO DI PROTOZOI INTESTINALI

Saggio di amplificazione di DNA in vitro per la determinazione qualitativa di *Cryptosporidium spp.*, *Giardia intestinalis*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* e *Blastocystis hominis* in campioni fecali.

CODICI PRODOTTO: EP001 (100 test) - EP001-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 Bisolfite, 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.

MATERIALI FORNITI:

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

**MATERIALI NECESSARI
MA NON FORNITI:**

Termociclatore Real-Time PCR 96 o 384 pozzetti
Piastre 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 piastre/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 Protozoi intestinali **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 A" nella provetta "PCR componenti A" e l'intero contenuto della provetta "PCR mastermix B" nella provetta "PCR componenti B". Aliquotare ciascuna miscela combinata (A e B) nei singoli pozzetti PCR di una piastra PCR ed aggiungere ogni campione eluato in un 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>D. fragilis</i>	96.7	99.6
<i>G. intestinalis</i>	90.9	100
<i>B. hominis</i>	92	100
<i>Criptosporidium</i>	100	100
<i>Entamoeba histolica</i>	100	100

Limite di rilevamento di 10 copie di genoma dei protozoi bersaglio.

**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).