

RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II

REF PG1725



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* en muestras de heces humanas.

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II está concebido como una ayuda para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales causadas por parásitos.

2. Resumen y descripción del ensayo

Giardia lamblia, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* son los protozoos más importantes que provocan diarrea.

Giardia lamblia (sinónimo *G. intestinalis* o *G. duodenales*) es una de las causas más importantes de diarrea. Según los CDC (Centros para el Control de Enfermedades de Estados Unidos), aproximadamente el 2 % de todos los adultos, el 6 - 8 % de todos los niños en países desarrollados y cerca de una tercera parte de la población total en los países en desarrollo están infectados con giardiasis.¹ Los CDC calculan unos 77 000 casos de giardiasis al año en Estados Unidos.² La infección por *G. lamblia* se produce por ingestión de los quistes en alimentos contaminados, agua potable o por vía fecal-oral de persona a persona. El periodo de incubación va de 1 a 3 semanas. Los síntomas de giardiasis (lamblisis) son diarrea aguda o crónica, pero también se produce la eliminación asintomática de quistes. Los síntomas agudos incluyen diarrea líquida, pérdida de apetito, náuseas, retortijones y pérdida de peso.¹

Cryptosporidium parvum es una de varias especies del género *Cryptosporidium*. Además de *C. parvum*, *C. hominis* es también una de las causas más comunes de criptosporidiosis en humanos.⁶ No obstante, la infección por otras especies de *Cryptosporidium* spp., como *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* y *C. muris* también puede causar síntomas clínicos.³ Se detectó criptosporidiosis en hasta el 0,2 % de las personas sanas y en cerca del 2 % de los pacientes con diarrea en los países desarrollados. En los países en desarrollo, la prevalencia aumentó hasta el 9 %. En pacientes con VIH y diarrea, se detectó *Cryptosporidium* spp. Hasta en un 14 - 24 % mientras que hasta 5 % de los pacientes con VIH asintomáticos estaban infectados.^{4,5} Durante un brote en Milwaukee, EE. UU. en 1993, se enfermaron más de 400 000 personas.⁶ Se calculan 748 000 casos de criptosporidiosis en Estados Unidos cada año.⁷ La infección se produce por la ingestión de ooquistes en agua y alimentos contaminados, así como por vía fecal-oral de persona a persona. En las personas inmunocompetentes, la enfermedad se manifiesta después de 2 a 10 días como diarrea líquida autolimitante, y puede ir acompañada de náuseas, dolor abdominal y pérdida de peso. Las personas inmunodeficientes desarrollan con frecuencia una enfermedad grave, crónica y en ocasiones mortal.^{2,6}

Entamoeba histolytica es la única especie patógena humana del género *Entamoeba* y es el agente causal de la amebiasis. La infección por *E. histolytica* se produce por ingestión de quistes en alimentos contaminados, agua potable o por vía fecal-oral de persona a persona. La mayoría de las infecciones por *E. histolytica* se manifiestan como una colonización asintomática. En el 10 % de los casos, la infección causa colitis amebiana y, en raras ocasiones, amebiasis extraintestinal, principalmente en el hígado (absceso hepático amebiano). Los síntomas clínicos de la amebiasis intestinal son dolor de estómago y diarrea grave con heces sanguinolentas y mucosas. La OMS calcula que unos 50 millones de personas en todo el mundo padecen amebiasis cada año, lo que ocasiona 100 000 muertes cada año.^{2,8} El diagnóstico clásico de *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba* spp. se hace por examen microscópico de las muestras de heces, lo que requiere personal con experiencia. El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II es un método alternativo, nuevo y atractivo para analizar las muestras de heces, y ha demostrado ser altamente sensible y específico para la detección simultánea de los tres parásitos más importantes que causan diarrea (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*).

3. Principio del ensayo

RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* en muestras de heces humanas. Después de aislar el ADN, se amplifican los fragmentos génicos (ITS1-18S, si está presente) específicos de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*.

Las dianas amplificadas de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel II contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra y para determinar la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarilla
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	roja
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanca
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de vencimiento. Después de la fecha de vencimiento, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado y por completo los reactivos antes de utilizarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 5 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de forma adecuada (2 - 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA[®] GENE Parasitic Stool Panel II es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipamiento necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Equipo de PCR en tiempo real:	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler[®] 480II y el LightCycler[®] 480 z
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador vórtex
- Pipetas (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (Grado BioScience, sin nucleasas, agua tratada con DEPC)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Seguir las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetear muestras ni reactivos con la boca. Evitar el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, llevar ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lavarse las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fumar, comer ni beber en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilizar el kit después de la fecha de vencimiento.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consultar las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consultar la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ADN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:3 con agua antes de la extracción. Mezcle en un agitador vórtex a alta velocidad la muestra de heces diluida y centrifúguela a 1000 x g durante 30 segundos. Use el volumen de sobrenadante adecuado, según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA[®]GENE Parasitic stool panel II contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitoriza la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda añadir 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada corrida del ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control DNA** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 - 8 °C) durante el paso de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD solo como control de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla para PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Añada 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda añadir 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

Muestra: Agregue 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda añadir 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos brevemente y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7 y 8).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de ADN por PCR en tiempo real para los equipos serie LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil de ADN por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA® GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 480II	<i>Giardia lamblia</i>	465/510	Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	533/610	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Giardia lamblia</i>	465/510	Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	540/610	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	610/670	
ABI 7500	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna)
	ICD	VIC	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno)
	ICD	HEX	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Giardia lamblia</i>	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada
	ICD	Amarillo	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Naranja	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Rojo	
Bio-Rad CFX96™	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	

10. Control de Calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figuras 1, 2 y 3) para determinar una corrida válida.

El **Positive Control** para *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada corrida de PCR se usa una cantidad total de 5×10^3 copias, respectivamente.

Tabla 10: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	NA * ¹	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

*¹No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de vencimiento de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

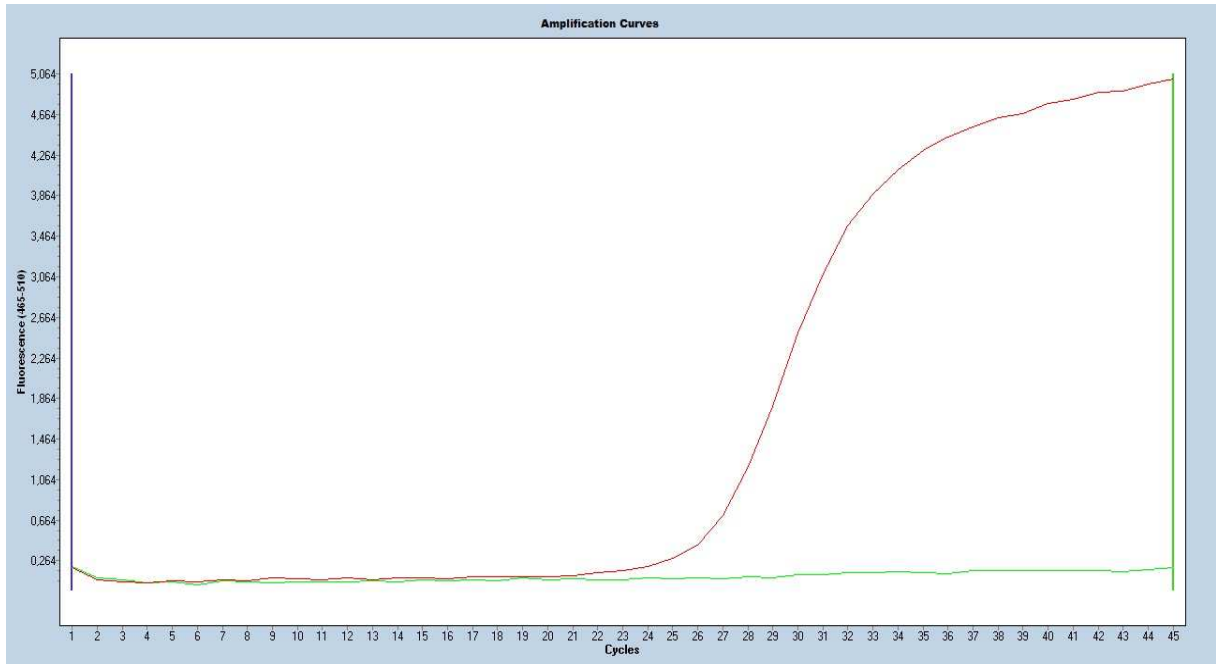


Fig. 1: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (*Giardia lamblia*) en el LightCycler® 480II

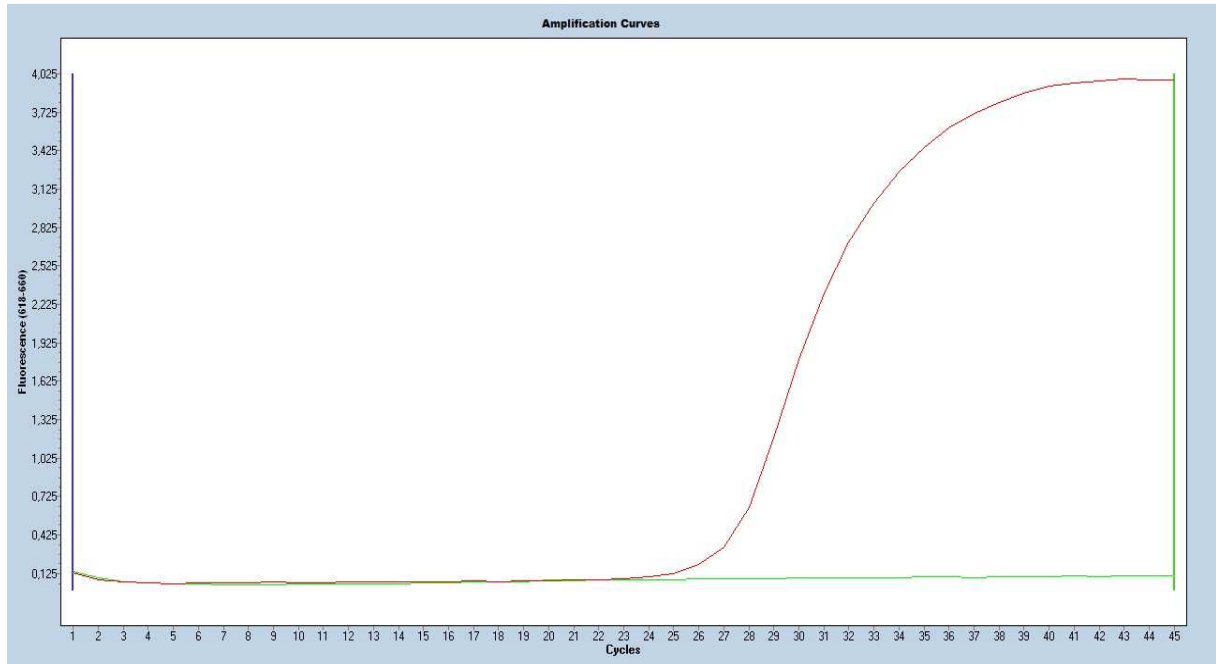


Fig. 2: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (*Cryptosporidium* spp.) en el LightCycler® 480II

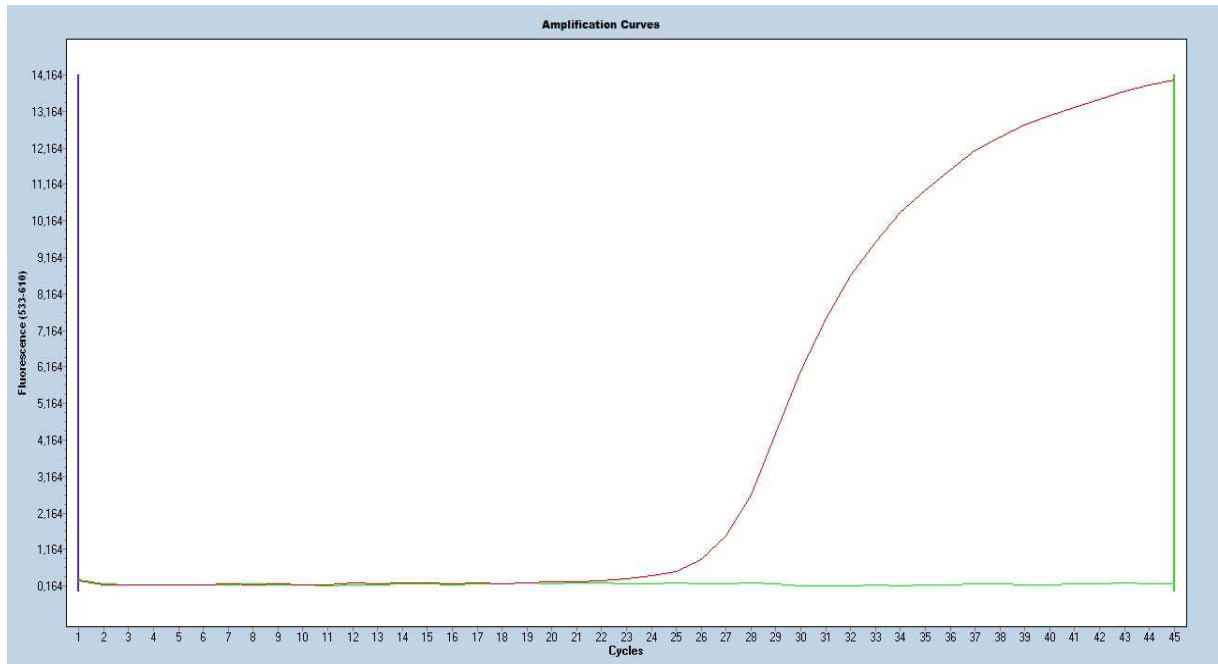


Fig. 3: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (*Entamoeba histolytica*) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

Tabla 11: Interpretación de las muestras

Genes diana			ICD	Resultado
<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Crypto. spp.</i>		
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> detectada
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>E. histolytica</i> detectada
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Crypto. spp.</i> detectado
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> detectadas
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> y <i>Crypto. spp.</i> detectados
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>E. histolytica</i> y <i>Crypto. spp.</i> detectados
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> y <i>Crypto. spp.</i> detectados
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

Giardia lamblia, *Cryptosporidium spp.* y *Entamoeba histolytica* se detectan si hay señal de amplificación del ADN de la muestra y se observa una señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección.

Giardia lamblia, *Cryptosporidium spp.* y *Entamoeba histolytica* también se detectan si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del **Internal Control DNA** no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del control de amplificación interno sea débil o esté ausente.

Giardia lamblia, *Cryptosporidium spp.* y *Entamoeba histolytica* no se detectan si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra y se observa una señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de

la reacción de PCR o un fallo en el procedimiento de extracción se pueden excluir por la detección del **Internal Control DNA** .

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra para *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*, y el **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR o se produjo un fallo en el procedimiento de extracción. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismo en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®] GENE Parasitic Stool Panel II.
6. Como ocurre con todas las pruebas diagnósticas de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LoD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia de los genes diana (ITS1-18S).

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción para *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*, respectivamente. Las siguientes figuras 4, 5 y 6 muestran una dilución seriada de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN por μl en cada caso) en el LightCycler® 480II.

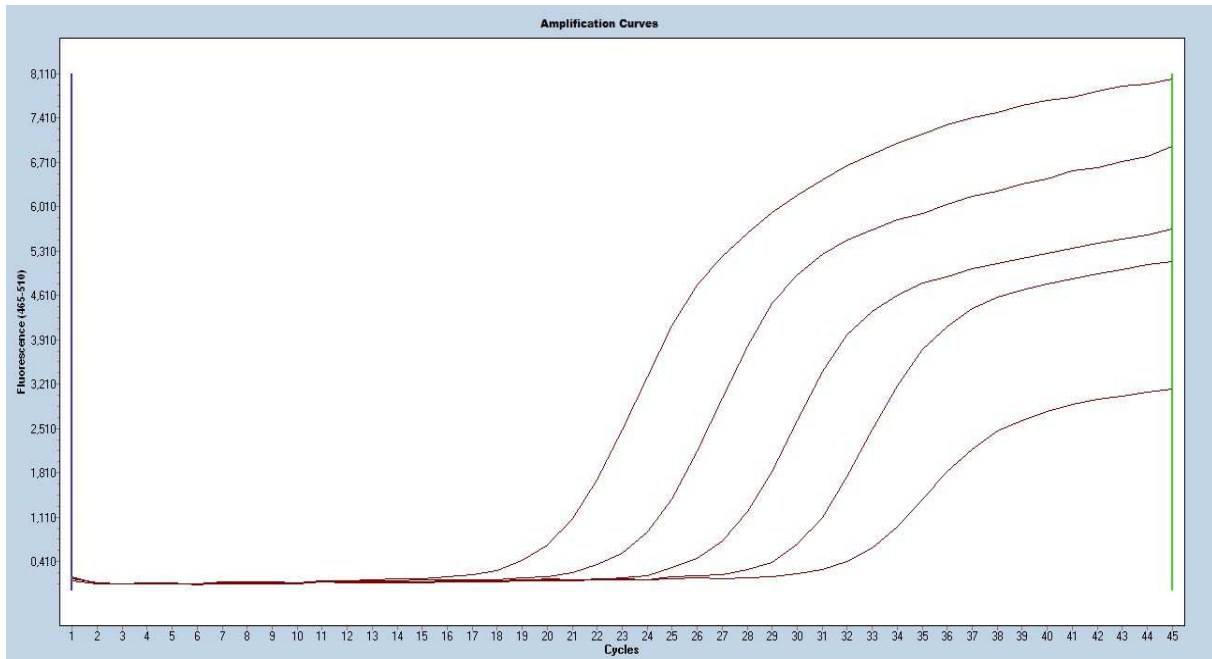


Fig. 4: Dilución seriada de *Giardia lamblia* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN/ μl) en el LightCycler® 480II

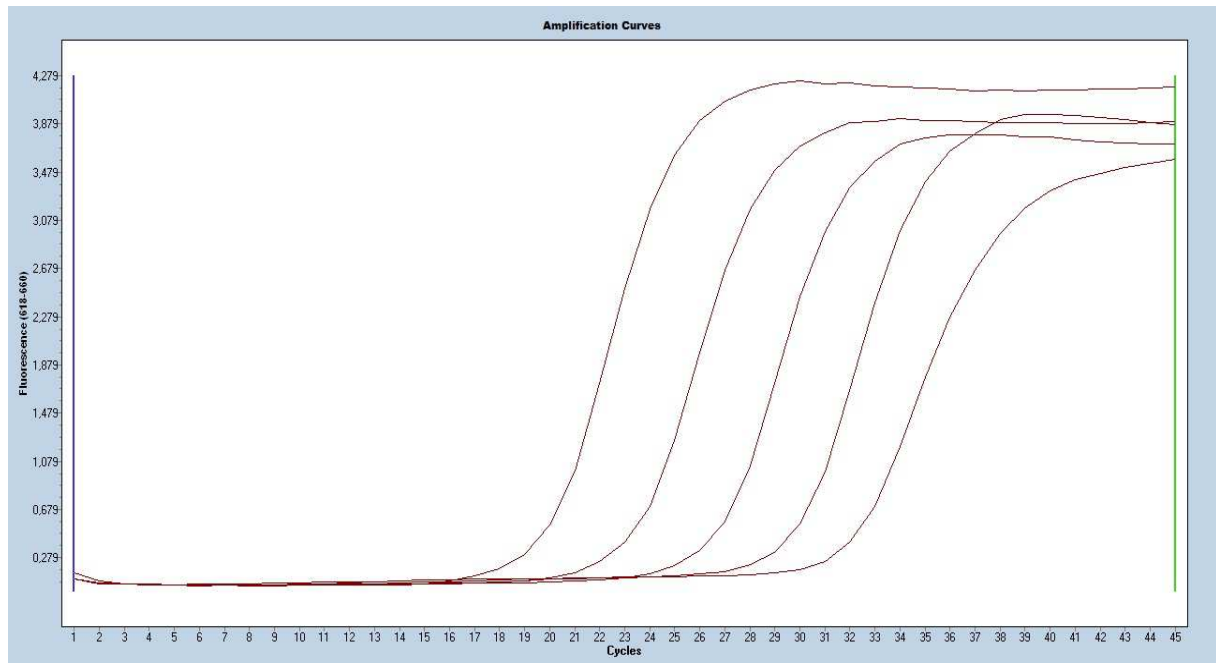


Fig. 5: Dilución seriada de *Cryptosporidium* spp. (10^5 - 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler® 480II

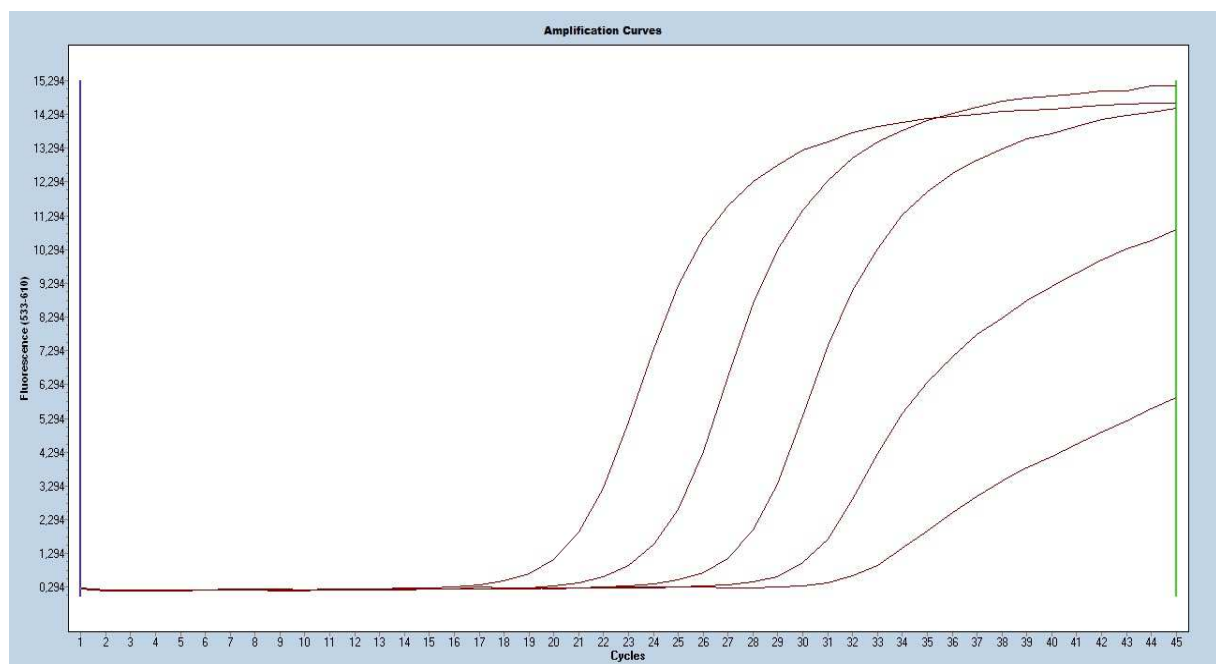


Fig. 6: Dilución seriada de *Entamoeba histolytica* (10^5 - 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

13.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II es específica para *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12):

Tabla 12: Pruebas de reactividad cruzada

Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Echovirus tipo 11	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Enterovirus tipo 71	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	Coxsackievirus B4	-	Norovirus GGI	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GGII	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	

13.3 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II se evaluó con *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* (consulte la tabla 13). Todas las cepas de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* evaluadas fueron detectadas por el ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II o por alineación de secuencias.

Tabla 13: Pruebas de reactividad analítica










<i>Giardia lamblia</i>					
<i>Giardia lamblia</i>	+	<i>G. intestinales</i> Portland 1	+	<i>G. intestinales</i> WB clon 6	+
<i>Entamoeba histolytica</i>					
<i>E. histolytica</i>	+				
<i>Cryptosporidium</i> spp.					
<i>C. baileyi</i>	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. sp skunk</i>	+
<i>C. bovis</i>	+	<i>C. muris</i>	+	<i>C. ubiquitum</i>	+
<i>C. canis</i>	+	<i>C. parvum</i>	+	<i>C. viatorum</i>	+
<i>C. cuniculus</i>	+	<i>C. sp caballo</i>	+	<i>C. xiaoi</i>	+
<i>C. felis</i>	+				

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
11/08/2014	Versión de lanzamiento
09/04/2018	Revisión general
09/04/2018	4. Reactivos suministrados 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 9. Ejecución de la prueba 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Referencias bibliográficas

1. Centers for Disease Control and Prevention 2011. Giardia Epidemiology & Risk Factors, <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>. Accessed 10.07.2012.
2. Food and Drug Administration (FDA) 2011. Bad Bug Book 2nd Edition. <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodborneopathogensnaturaltoxins/badbugbook/default.htm>. Accessed 10.07.2012.
3. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>. Accessed 07.03.2014.
4. Robert Koch Institut 2010. Kryptosporidiose (Cryptosporidium parvum). RKI-Ratgeber für Ärzte 2004. Accessed 24.07.2012.
5. LEE JK, SONG HJ and Jae-Ran YU JR. Prevalence of diarrhea caused by Cryptosporidium parvum in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea. Korean J Parasitol. 2005, 43(3):111-114.
6. Leitch GJ and Qing He. Cryptosporidiosis - an overview. J Biomed Res. 2012, 25(1): 1-16.
7. Scallan E et al. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011, 17(1): 7-15.
8. Fotedar R et al. Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. Clin Microbiol Rev. 2007, 20(3):511-532.

