

RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis*

REF PG1745



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis* es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de *Dientamoeba fragilis* en muestras de heces humanas.¹ La PCR multiplex en tiempo real de RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis* está concebida como una ayuda para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales causadas por *Dientamoeba fragilis*.

2. Resumen y descripción del ensayo

El *Dientamoeba fragilis* es uno de los principales protozoarios causantes de diarrea y se distribuye en todo el mundo. Estudios recientes demuestran su potencial patógeno y lo han implicado como una causa común de enfermedad gastrointestinal. La infección por *Dientamoeba fragilis* puede ser sintomática o asintomática. Los síntomas de dientamebiasis son dolor abdominal y diarrea. La prevalencia de *Dientamoeba fragilis* varía entre el 0,3 % y el 52 %, y con frecuencia supera la de *Giardia lamblia*.^{2,3}

El diagnóstico clásico de *Dientamoeba fragilis* se hace por examen microscópico de las muestras de heces, para lo que se requiere personal con experiencia. El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis* es un método alternativo, nuevo y atractivo, para analizar muestras de heces, y se ha demostrado que es muy sensible y específico para la detección de *Dientamoeba fragilis*.

3. Principio del ensayo

El RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis* es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de *Dientamoeba fragilis* en muestras de heces humanas.

Después del aislamiento del ADN, se produce la amplificación de los fragmentos génicos (ITS1-18S, si están presentes) específicos de *Dientamoeba fragilis*. La diana amplificada se detecta 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 *Dientamoeba fragilis* contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o 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	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos contra la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, 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 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente dividir 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 Dientamoeba fragilis es adecuado para usarse 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
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
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).

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler® 2.0 (Roche)
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II (Roche)
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua de grado BioScience, sin nucleasas).

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba 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 utilice el kit después de la fecha de caducidad.

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

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

8. Recolección y almacenamiento

8.1 Preparación del ADN 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 Dientamoeba fragilis contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea 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 deben 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 agregar 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 deben 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 °C a 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 de 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 agregar 1 µl de **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: Agregue 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 agregar 1 µl de **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® 2.0	<i>Dientamoeba fragilis</i>	530	Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) (PG0004)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Dientamoeba fragilis</i>	465/510	Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Dientamoeba fragilis</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
Stratagene Mx3005P	<i>Dientamoeba fragilis</i>	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Dientamoeba fragilis</i>	Verde	-
	ICD	Amarillo	
Bio-Rad CFX96™	<i>Dientamoeba fragilis</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivos y negativos deben mostrar los resultados correctos (consulte la figura 1).

El **Positive Control** de *Dientamoeba fragilis* tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

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

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

*¹ No se requiere un valor de Ct del ICR 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 caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

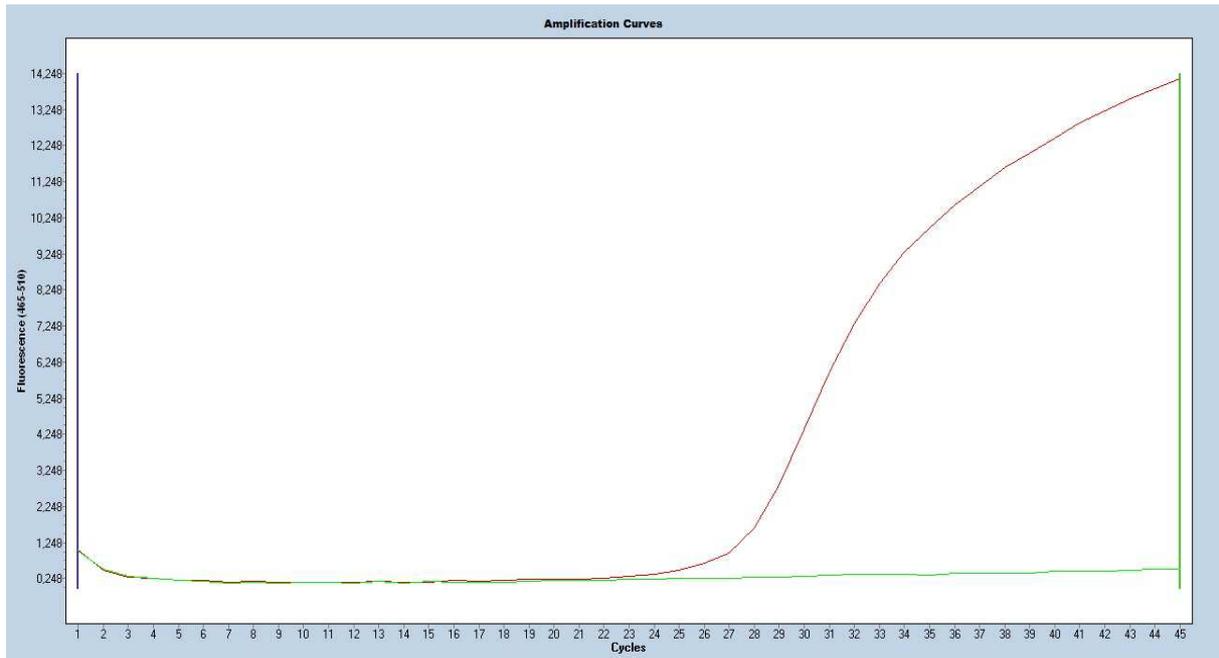


Figura 1: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Dientamoeba fragilis*) en el LightCycler® 480II

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		
<i>Dientamoeba fragilis</i>	ICD	Resultado
positivo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> detectada
negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	No válido

Se detecta *Dientamoeba fragilis* si el ADN de la muestra y el Internal Control DNA muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se detecta *Dientamoeba fragilis* si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del Internal Control DNA en el sistema de detección. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del Internal Control DNA sea débil o esté ausente.

No se detecta *Dientamoeba fragilis* si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra ni del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. 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 polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®]GENE *Dientamoeba fragilis*.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos 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 del ensayo 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 *Dientamoeba fragilis* tiene un límite de detección de ≥ 50 copias de ADN por reacción para *Dientamoeba fragilis*.

En la figura 2 se muestra una dilución seriada de *Dientamoeba fragilis* (10^5 - 10^1 copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II.

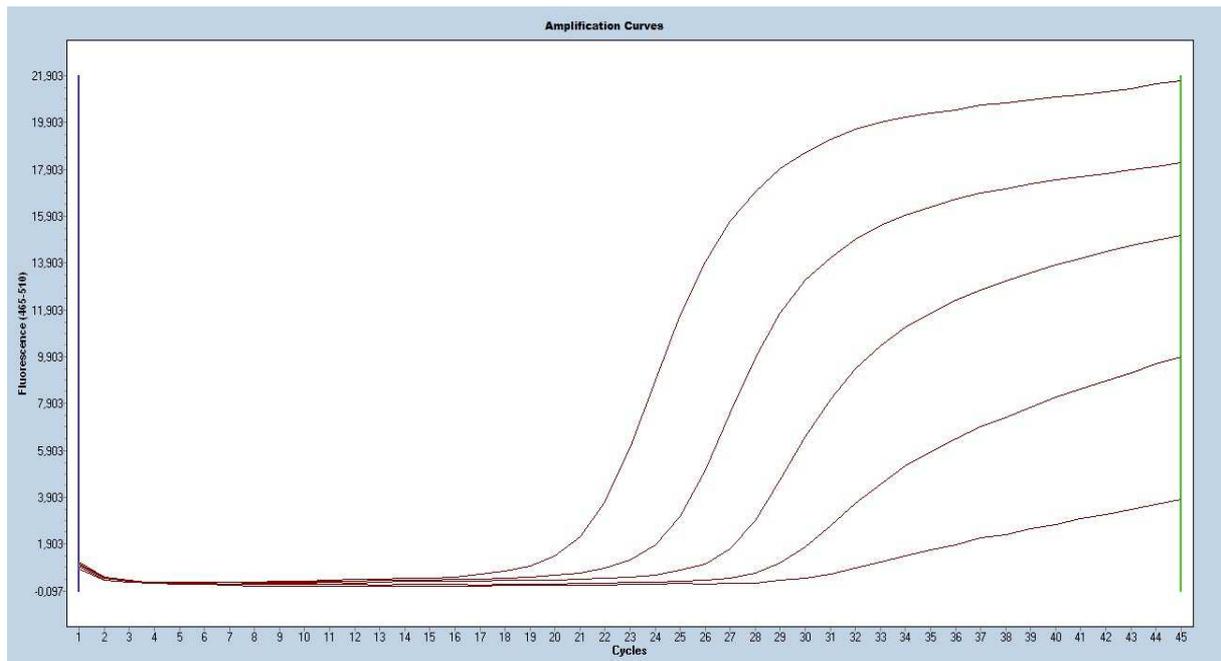


Fig.2: Dilución seriada de *Dientamoeba fragilis* (10^5 – 10^1 copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

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 *Dientamoeba fragilis* es específica para *Dientamoeba fragilis* de muestras de heces humanas. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12).

Tabla 12: Ensayos de reactividad cruzada

Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Norovirus GGII	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon C6	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subespecie <i>lari</i>	-						

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2013-11-12	Versión de lanzamiento
2018-07-17	Revisión general
2018-07-17	4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 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>
	Consulte 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. Bibliografía

1. Calderaro A *et al.* Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010, 67(3):239-245.
2. Stark D *et al.* A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2010, 82(4):614-619.
3. Baratt JLN *et al.* A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes.* 2011, 2(1):3-12.

