

RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis*

REF PG1745



1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. RIDA[®]GENE *Dientamoeba fragilis* est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Dientamoeba fragilis* dans les échantillons de selles humaines¹. Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE *Dientamoeba fragilis* est destiné à faciliter le diagnostic des infections gastro-intestinales provoquées par *Dientamoeba fragilis*.

2. Résumé et explication du test

Dientamoeba fragilis est l'un des principaux protozoaires à l'origine de diarrhées et il est répandu dans le monde entier. De récentes études ont démontré son potentiel pathogène et l'ont impliqué comme une cause principale de maladie gastro-intestinale. Les infections par *Dientamoeba fragilis* peuvent être symptomatiques ou asymptomatiques. Les symptômes de la dientamoebiose sont des douleurs abdominales et des diarrhées. La prévalence de *Dientamoeba fragilis* varie de 0,3 à 52 % et dépasse souvent celle de *Giardia lamblia*^{2,3}.

Généralement, la détection de *Dientamoeba fragilis* se fait par examen microscopique d'échantillons fécaux, ce qui nécessite un personnel compétent. Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE *Dientamoeba fragilis* est une nouvelle méthode alternative intéressante pour l'analyse d'échantillons de selles. Il s'est révélé hautement sensible et spécifique pour la détection de *Dientamoeba fragilis*.

3. Principe du test

Le test RIDA[®]GENE *Dientamoeba fragilis* est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Dientamoeba fragilis* dans des échantillons de selles humaines.

Après isolation de l'ADN, on procède à l'amplification des fragments de gène (ITS1-18S, si présent) spécifiques pour *Dientamoeba fragilis*. La cible amplifiée est détectée grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons.

Pendant l'étape d'extension, la **Taq-Polymerase** rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA[®]GENE *Dientamoeba fragilis* contient un **Internal Control DNA** (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rouge
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE Dientamoeba fragilis peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

Tableau 2 Matériel nécessaire

Plateforme d'extraction	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).

- Kit de compensation de couleur RIDA[®]GENE II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler[®] 2.0 (Roche)
- Kit de compensation de couleur RIDA[®]GENE IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler[®] 480II (Roche)
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (eau de qualité BioScience, sans nucléase).

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation

8.1 Préparation de l'ADN à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ADN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer les échantillons de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/3. Agiter fortement l'échantillon de selles dilué et le centrifuger à 1 000 x g pendant 30 s. Utiliser le volume adéquat du surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA[®]GENE Dientamoeba fragilis inclut un Internal Control DNA qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante.

Si le Internal Control DNA est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de Internal Control DNA au mélange maître (voir tableau 4).

Si le Internal Control DNA est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de Internal Control DNA pendant la procédure d'extraction. Le Internal Control DNA doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl de Internal Control DNA au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle négatif dans chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3 et 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], le [Positive Control], le [No Template Control] et le [Internal Control DNA] avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

Tableau 3 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

Tableau 4 : Exemple de calcul et de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
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

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

Contrôle négatif : Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si le **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

Échantillon : Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN au mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif : Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si le **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger brièvement et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6, 7 et 8).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

Tableau 5 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI7500 et CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel d'ADN et d'ARN RIDA® GENE sont effectués lors d'une même exécution.

Tableau 7 : Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler®

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 8 : Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Détection Canal	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	<i>Dientamoeba fragilis</i>	530	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) est nécessaire
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Dientamoeba fragilis</i>	465/510	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Dientamoeba fragilis</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
Stratagene Mx3005P	<i>Dientamoeba fragilis</i>	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Dientamoeba fragilis</i>	Vert	-
	ICD	Jaune	
Bio-Rad CFX96™	<i>Dientamoeba fragilis</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent obtenir des résultats corrects (voir Fig. 1).

Le **Positive Control** pour *Dientamoeba fragilis* a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

Tableau 10 : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Positive Control	Positif	S/O * ¹	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative Control	Négatif	Ct > 20	0

*¹ Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test

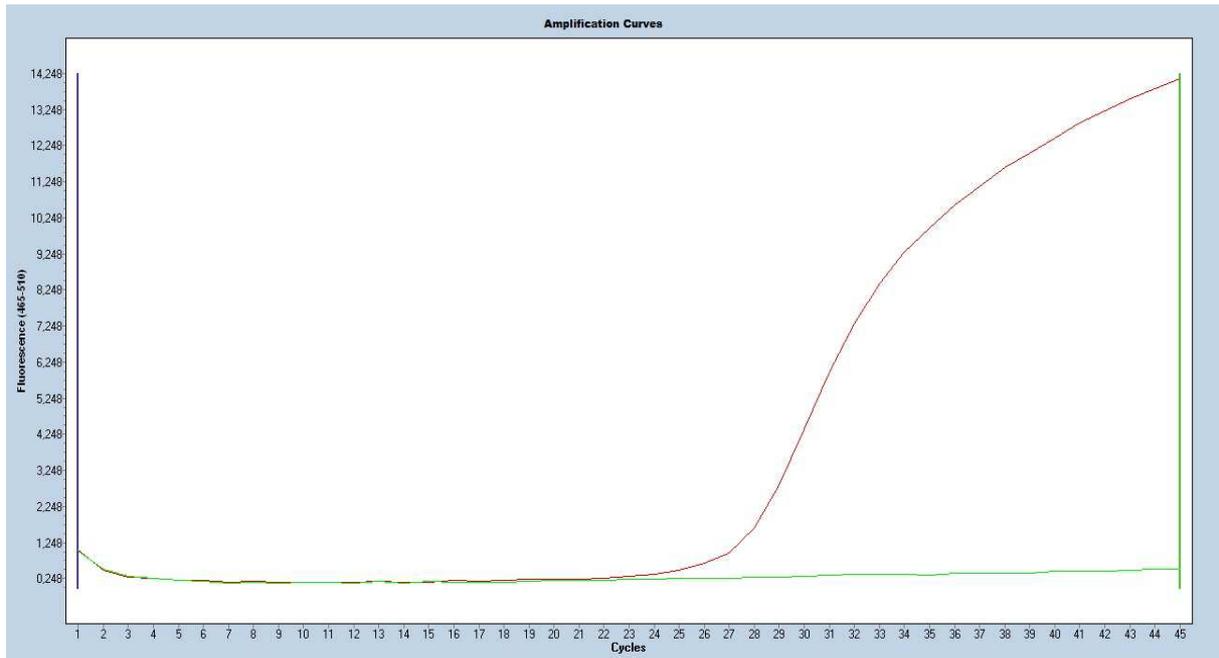


Figure 1 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Dientamoeba fragilis*) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

Tableau 11 : Interprétation des échantillons

Gènes cibles		
<i>Dientamoeba fragilis</i>	ICD	Résultat
positif	positif/négatif	<i>D. fragilis</i> détecté
négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	Non valide

Dientamoeba fragilis est détecté si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control DNA présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Dientamoeba fragilis est également détecté si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le Internal Control DNA. La détection du contrôle d'amplification interne n'est pas nécessaire, car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent de l'ADN de contrôle interne Internal Control DNA.

Dientamoeba fragilis n'est pas détecté si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le **Internal Control DNA**. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du **Internal Control DNA**.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA[®]GENE *Dientamoeba fragilis*.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence des gènes cibles (ITS1-18S).

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis* est ≥ 50 copies d'ADN par réaction pour *Dientamoeba fragilis*.

La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions de *Dientamoeba fragilis* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II.

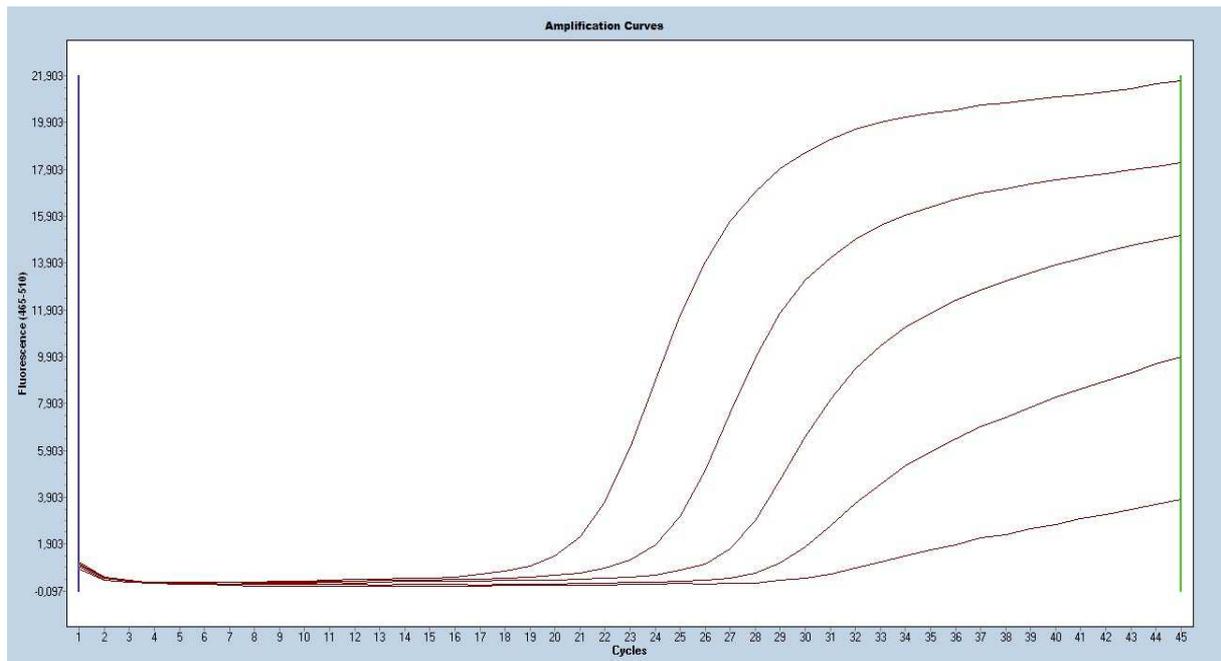


Fig. 2 : Série de dilutions de *Dientamoeba fragilis* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

13.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®] GENE *Dientamoeba fragilis* concerne *Dientamoeba fragilis* dans les échantillons de selles humaines. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 12).

Tableau 12 : Test de la réactivité croisée

Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Norovirus GGII	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adénovirus 41, humain, souche 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 Clone 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> sous-esp. <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> subsp. <i>lari</i>	-						

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2013-11-12	Version de la publication
2018-07-17	Révision générale
2018-07-17	4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation des réactifs 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Sans objet

16. Bibliographie

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.

