

## RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis*

**REF** PG1745



## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA<sup>®</sup>GENE *Dientamoeba fragilis* è un test PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta di *Dientamoeba fragilis* da campioni di feci umane.<sup>1</sup> Il test PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE *Dientamoeba fragilis* è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi delle infezioni gastrointestinali causate da *Dientamoeba fragilis*.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Il *Dientamoeba fragilis* è uno dei più importanti protozoi che causano la diarrea ed è diffuso in tutto il mondo. Studi recenti hanno dimostrato il potenziale patogeno del virus, indicandolo come una causa comune delle malattie gastrointestinali.

L'infezione da *Dientamoeba fragilis* può essere sintomatica o asintomatica. I sintomi della dientamoebiasi sono dolore addominale e diarrea. La prevalenza di *Dientamoeba fragilis* varia dallo 0,3 % al 52 % e spesso supera quella della *Giardia lamblia*.<sup>2,3</sup>

Tipicamente, la diagnosi di infezione da *Dientamoeba fragilis* avviene mediante l'esame microscopico di campioni fecali, ad opera di personale esperto. Il test PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE *Dientamoeba fragilis* è un metodo alternativo nuovo e funzionale per testare i campioni di feci e ha dimostrato di essere altamente sensibile e specifico per la rivelazione di *Dientamoeba fragilis*.

## 3. Principio del test

Il RIDA<sup>®</sup>GENE *Dientamoeba fragilis* è un test PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta di *Dientamoeba fragilis* da campioni di feci umane. Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione del frammento genetico (ITS1-18S, se presente) specifico per *Dientamoeba fragilis*. Il target amplificato viene rivelato con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA<sup>®</sup>GENE *Dientamoeba fragilis* contiene un **Internal Control DNA** (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e/o per la determinazione della possibile inibizione della PCR.

#### 4. Contenuto della confezione

**Tab. 1:** Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

#### 5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongellare i reagenti con cura e completamente prima dell'uso (es. in un frigorifero a 2-8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongellamento senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2-8 °C).

## 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE Dientamoeba fragilis è adatto per l'uso con le seguenti piattaforme di estrazione e strumenti per la PCR real-time:

**Tab. 2** Attrezzatura necessaria

Piattaforma di estrazione	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 2.0, LightCycler <sup>®</sup> 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 <sup>™</sup>
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Avvertenze: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.**

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'esecuzione sul LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Roche)
- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'esecuzione sul LightCycler<sup>®</sup> 480II (Roche)
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (acqua di grado bioscientifico, priva di nucleasi).

## 7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in stanze separate per evitare contaminazione crociata.

- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.

- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

## 8. Raccolta e conservazione

### 8.1 Preparazione del DNA da campioni fecali

Per l'isolamento del DNA da campioni di feci umane, utilizzare un kit di isolamento di DNA disponibile in commercio (ad es. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione di DNA (ad es. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore.

Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni di feci con acqua in rapporto 1:3. Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 x g per 30 s. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA<sup>®</sup> GENE Dientamoeba fragilis contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10 % a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tab. 3, Tab. 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], il [Positive Control], il [No Template Control] e l'[Internal Control DNA]. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2-8 °C).

**Tab. 3:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Totale</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

**Tab. 4:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
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
	<b>Totale</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

## 9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

**Controllo negativo:** dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Avvertenze:** se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

**Campione:** Dispensare 5 µl di DNA estratto alla Master Mix pre-pipettata.

**Controllo positivo:** Dispensare 5 µl di **Positive Control** alla Master Mix pre-pipettata.

**Avvertenze:** se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire brevemente lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

## 9.3 Impostazione dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

**Tab. 5:** Profilo della PCR real-time del DNA per le serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tab. 6:** Profilo della PCR real-time del DNA per Mx3005P, ABI7500 e CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

### 9.3.2 Profilo PCR real-time universale

**Avvertenze:** il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA® GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

**Tab. 7:** Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler®

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tab. 8:** Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.



## 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tab. 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Rivelazione Canale	Avvertenze
Roche LightCycler® 2.0	<i>Dientamoeba fragilis</i>	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) necessario
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Dientamoeba fragilis</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessario
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Dientamoeba fragilis</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
Stratagene Mx3005P	<i>Dientamoeba fragilis</i>	FAM	Controllare che non vi sia il colorante di riferimento
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Dientamoeba fragilis</i>	Verde	-
	ICD	Giallo	
Bio-Rad CFX96™	<i>Dientamoeba fragilis</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

## 10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. I controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Fig. 1).

Il **Positive Control** per *Dientamoeba fragilis* ha una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu$ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie.

**Tab. 10:** Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Positive Control	Positivo	NA * <sup>1</sup>	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

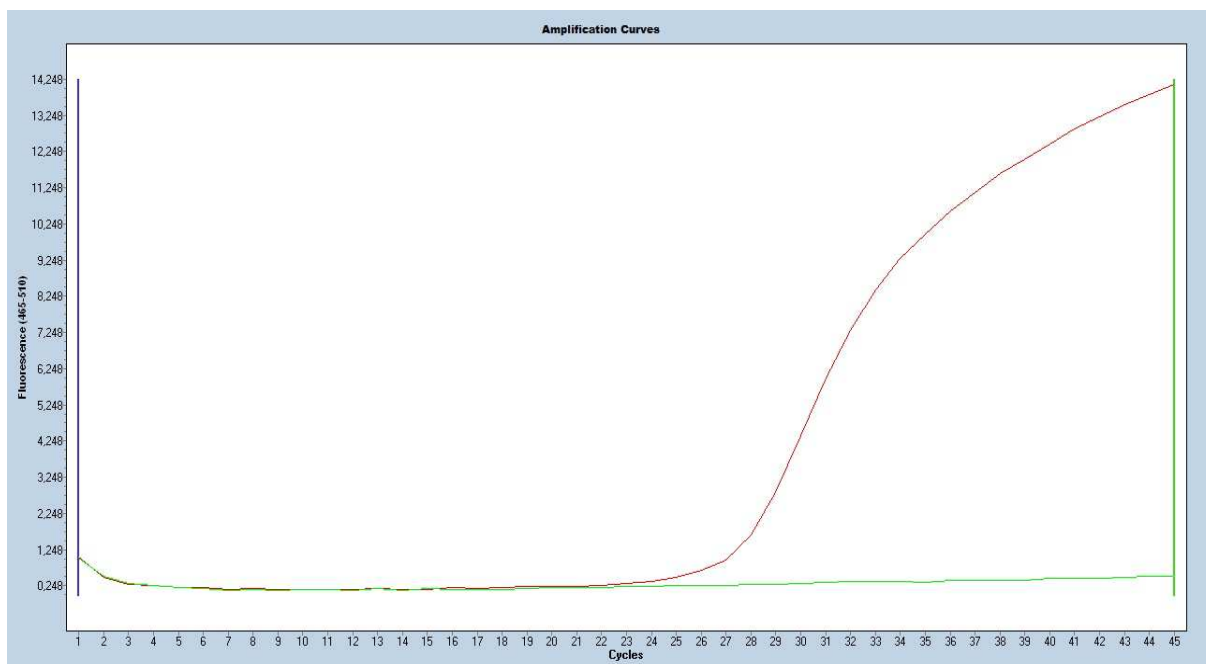
\*<sup>1</sup> Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICR.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



**Fig. 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Dientamoeba fragilis*) sul LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tab.11:** Interpretazione del campione

Geni target	ICD	Risultato
<i>Dientamoeba fragilis</i>	ICD	Risultato
positivo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> rilevato
negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	Non valido

Viene rivelato il *Dientamoeba fragilis* se sia il DNA del campione sia l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Il *Dientamoeba fragilis* è inoltre comprovabile se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'**Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'**Internal Control DNA** sia debole o assente.

Il *Dientamoeba fragilis* non è comprovabile se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma nel sistema di rivelazione è presente un segnale per l'**Internal Control DNA**. La rilevazione dell'**Internal Control DNA** esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'**Internal Control DNA** a mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

## 12. Limiti del metodo

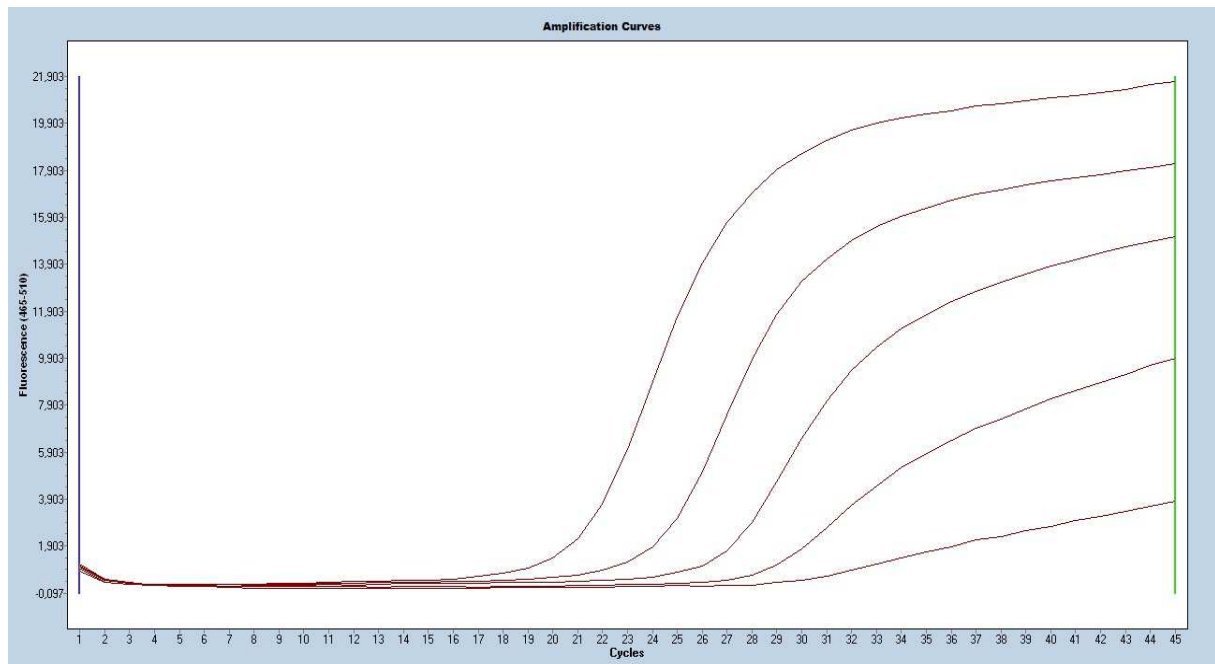
1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti con il test RIDA<sup>®</sup> GENE *Dientamoeba fragilis* e causare un falso negativo.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza dei geni target (ITS1-18S).

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Sensibilità analitica

Il test PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE *Dientamoeba fragilis* ha un limite di rivelazione  $\geq 50$  copie di DNA per reazione per il *Dientamoeba fragilis*.

La figura 2 seguente mostra una serie di diluizioni di *Dientamoeba fragilis* ( $10^5$  -  $10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig.2:** Serie di diluizioni di *Dientamoeba fragilis* ( $10^5$  –  $10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II

Il limite di rilevazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

## 13.2 Specificità analitica

La specificità analitica del test PCR real-time multiplex RIDA® GENE *Dientamoeba fragilis* è specifica per il *Dientamoeba fragilis* in campioni di feci umane. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 12).

**Tab. 12:** Test di reattività crociata










Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Norovirus GGII	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Clostridium bifirmentans</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> 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> sottosp. <i>lari</i>	-						

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2013-11-12	Versione di rilascio
2018-07-17	Revisione generale
2018-07-17	4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

### Simboli specifici nel test

Non pertinente

## 16. Bibliografia

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.