

## RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I

**REF** PG1715



## 1. Uso previsto

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

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

## 2. Resumen y descripción del ensayo

*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Dientamoeba fragilis* 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.<sup>1</sup> Los CDC calculan unos 77 000 casos de giardiasis al año en Estados Unidos.<sup>2</sup> 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.<sup>1</sup>

*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.<sup>4</sup> 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.<sup>3</sup> 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.<sup>5,6</sup> Durante un brote en Milwaukee, EE. UU. en 1993, se enfermaron más de 400 000 personas.<sup>4</sup> Se calcula que se producen 748 000 casos de criptosporidiosis en Estados Unidos cada año.<sup>7</sup> 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.<sup>2,4</sup>

*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.<sup>2,8</sup>

*Dientamoeba fragilis* tiene una distribución mundial y estudios recientes demuestran su potencial patógeno y lo han implicado como una causa común de enfermedades gastrointestinales. La infección por *D. fragilis* puede ser sintomática o asintomática. Los síntomas de dientamebiasis son dolor abdominal y diarrea. La prevalencia de *D. fragilis* varía entre el 0,3 % y el 52 %, y con frecuencia supera a la de *Giardia lamblia*.<sup>9,10</sup>

El diagnóstico clásico de *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. y *Dientamoeba fragilis* 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<sup>®</sup>GENE Parasitic Stool Panel I 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 cuatro parásitos más importantes que causan diarrea (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Dientamoeba fragilis*).

### 3. Principio del ensayo

RIDA<sup>®</sup>GENE Parasitic Stool Panel I es un PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Dientamoeba fragilis* 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., *Entamoeba histolytica* y *Dientamoeba fragilis*. Las dianas amplificadas de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Dientamoeba fragilis* se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor 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<sup>®</sup>GENE Parasitic Stool Panel I 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	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 **15 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 Parasitic Stool Panel I es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

**Tabla 2:** Equipo necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipo de PCR en tiempo real:	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P

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](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDAGENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II
- 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 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, consultar la hoja de datos de seguridad (SDS) en [www.r-biopharm.com](http://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<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> GENE Parasitic stool panel I 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 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, 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 la etapa 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

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:** Agregue 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 eluato 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 en el LightCycler® 480II

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

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 LightCycler® 480II

<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

<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>Dientamoeba fragilis</i>	440/488	<b>Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)</b>
	<i>Giardia lamblia</i>	465/510	
	ICD	533/580	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	533/610	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Dientamoeba fragilis</i>	ATTO	<b>Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno). «Filter Set Gain Settings» (Configuración de ganancia del juego de filtros) debe configurarse en 8 para ATTO.</b>
	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	
	ICD	HEX	
	<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, 3 y 4) para determinar una corrida válida.

El **Positive Control** tiene una concentración de  $10^3$  copias/ $\mu$ l. En cada corrida de PCR se usa una cantidad total de  $5 \times 10^3$  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	ND * <sup>1</sup>	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

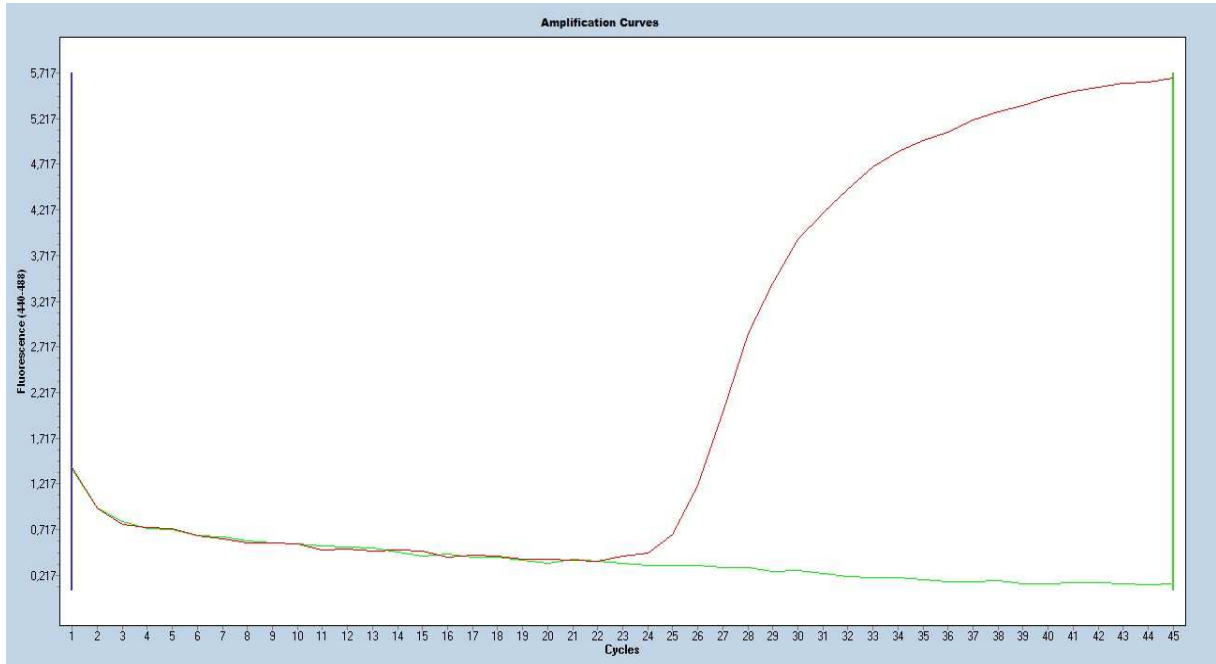
\*<sup>1</sup> No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo es positivo.

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.

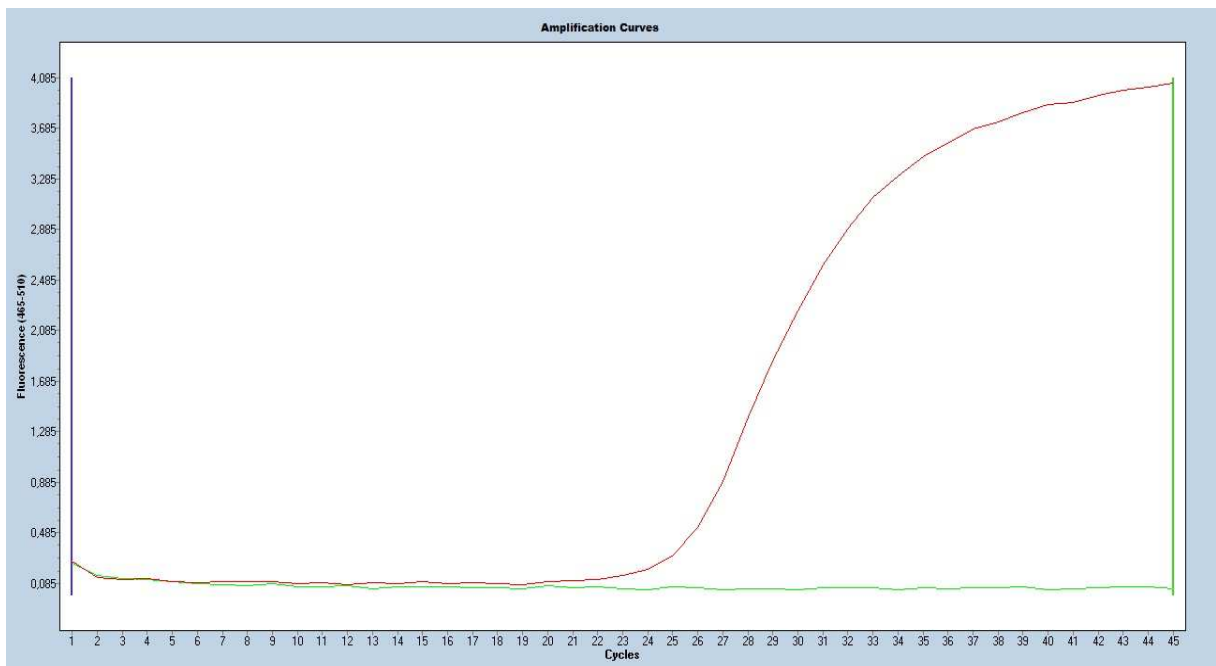
Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

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

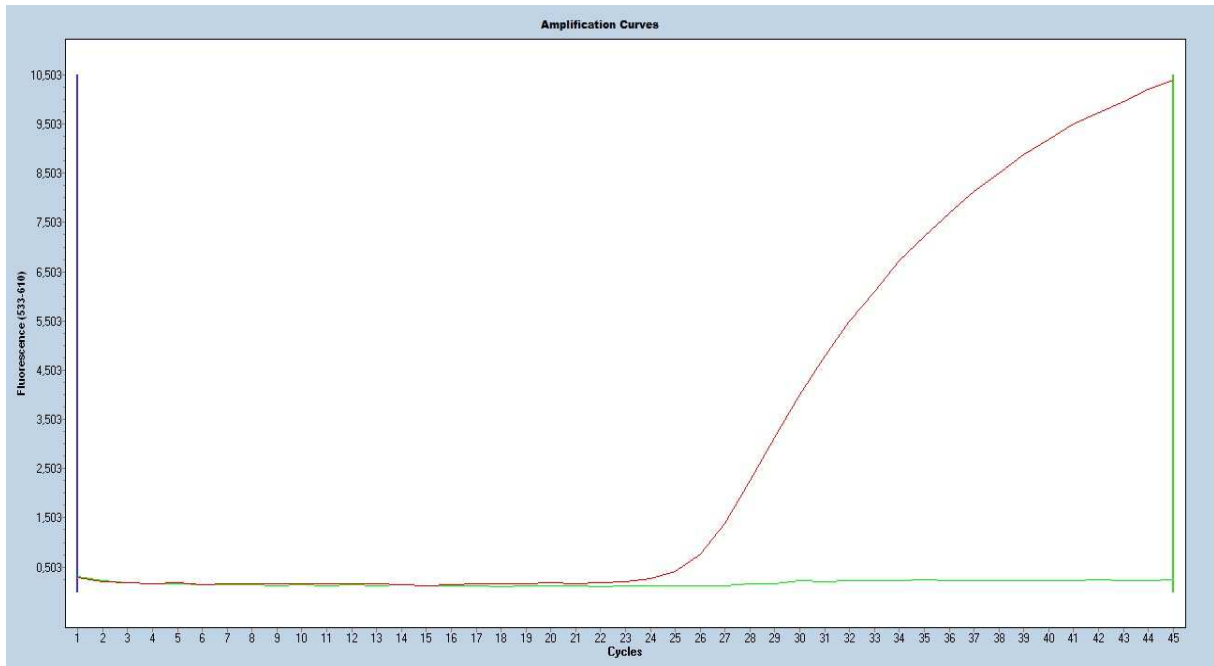
- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba



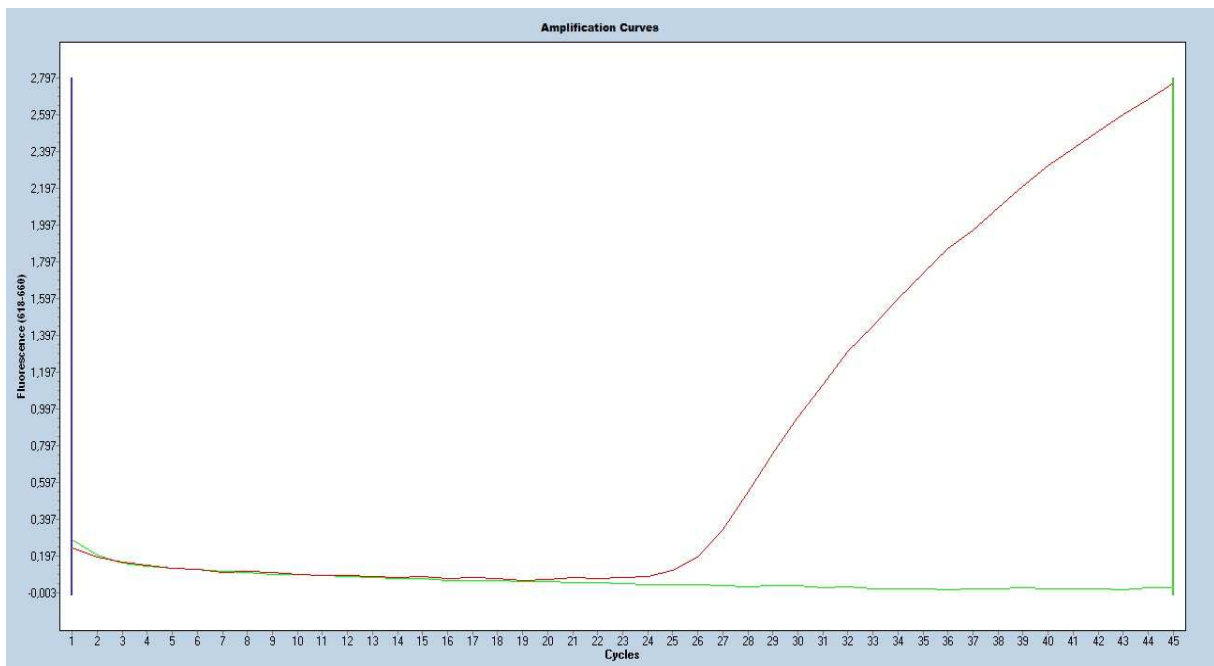
**Fig. 1:** Corrida correcta del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Dientamoeba fragilis*) en el LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Corrida correcta del control positivo (rojo) y control negativo (verde) (*Giardia lamblia*) en el LightCycler® 480II



**Fig. 3:** Corrida correcta del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Entamoeba histolytica*) en el LightCycler® 480II



**Fig. 4:** Corrida correcta del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Cryptosporidium* spp.) 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>D. fragilis</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Crypto. spp.</i>		
positivo	negativo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> detectada
negativo	positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> detectada
negativo	negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>E. histolytica</i> detectada
negativo	negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Cryptosporidium spp.</i> detectada
positivo	positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> y <i>G. lamblia</i> detectadas
positivo	negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> y <i>E. histolytica</i> detectadas
positivo	negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> detectadas
negativo	positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> detectadas
negativo	positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> detectadas
negativo	negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>E. histolytica</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> detectadas
positivo	positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> detectadas
positivo	positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> detectadas
positivo	negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> , <i>E. histolytica</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> detectadas
negativo	positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> detectadas
positivo	positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> detectadas
negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

La muestra se considera positiva 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.

También se considera positiva si hay señal de amplificación del ARN de la muestra, pero no 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.

La muestra se considera negativa 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 o un fallo en el procedimiento de extracción se pueden excluir por la detección del **Internal Control DNA**.

Se determina que una muestra no es válida si ni la muestra ni el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección. La muestra contenía 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

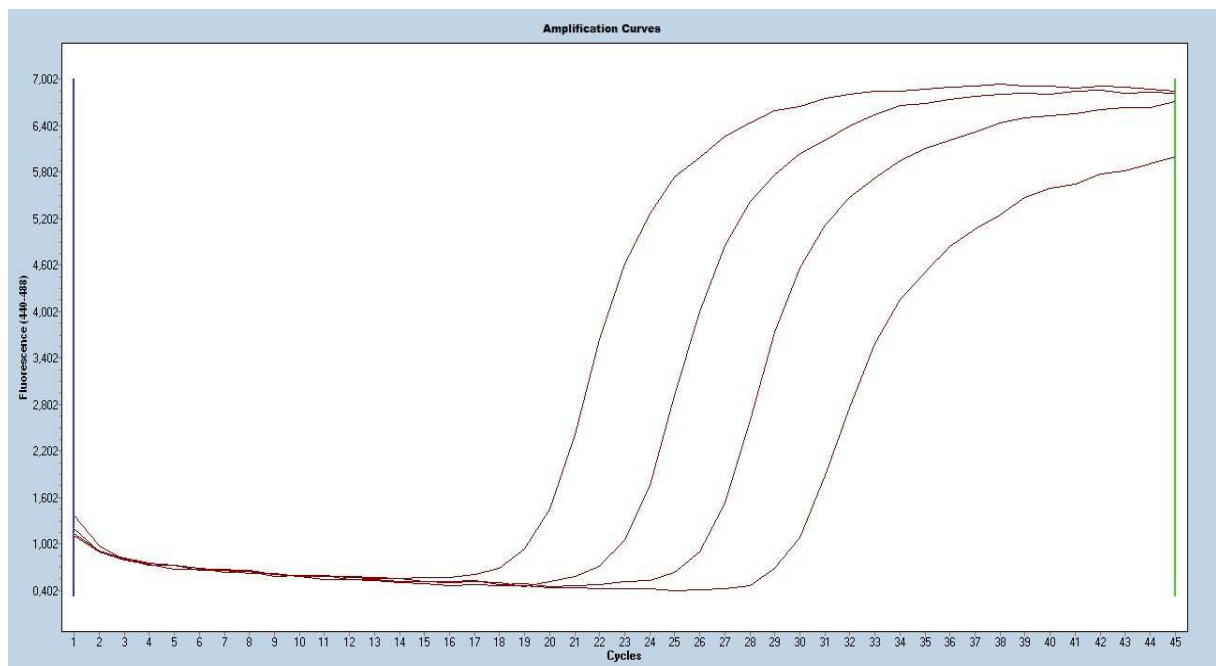
1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la 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 falso negativo con el ensayo RIDA<sup>®</sup> GENE Parasitic Stool Panel I.
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 (LD), 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

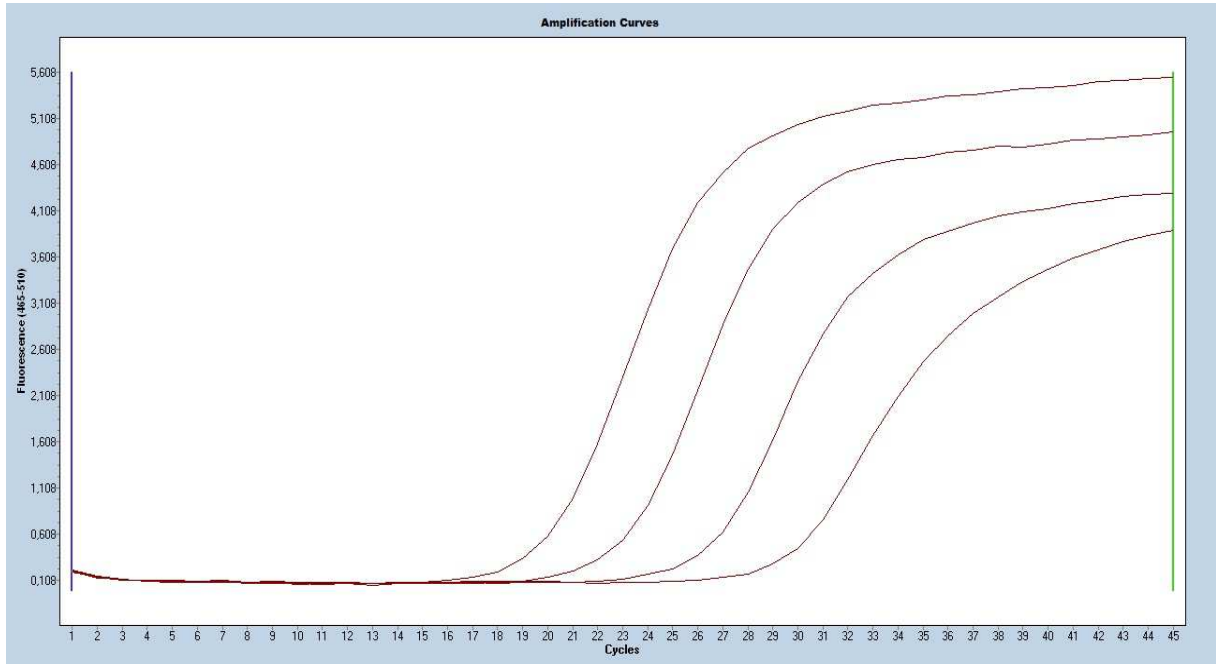
El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I tiene un límite de detección de  $\geq 50$  copias de ADN por reacción para *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*, respectivamente.

Las siguientes figuras 5, 6, 7 y 8 muestran una dilución seriada de *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* ( $10^5 - 10^2$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$  en cada caso) en el LightCycler® 480II.

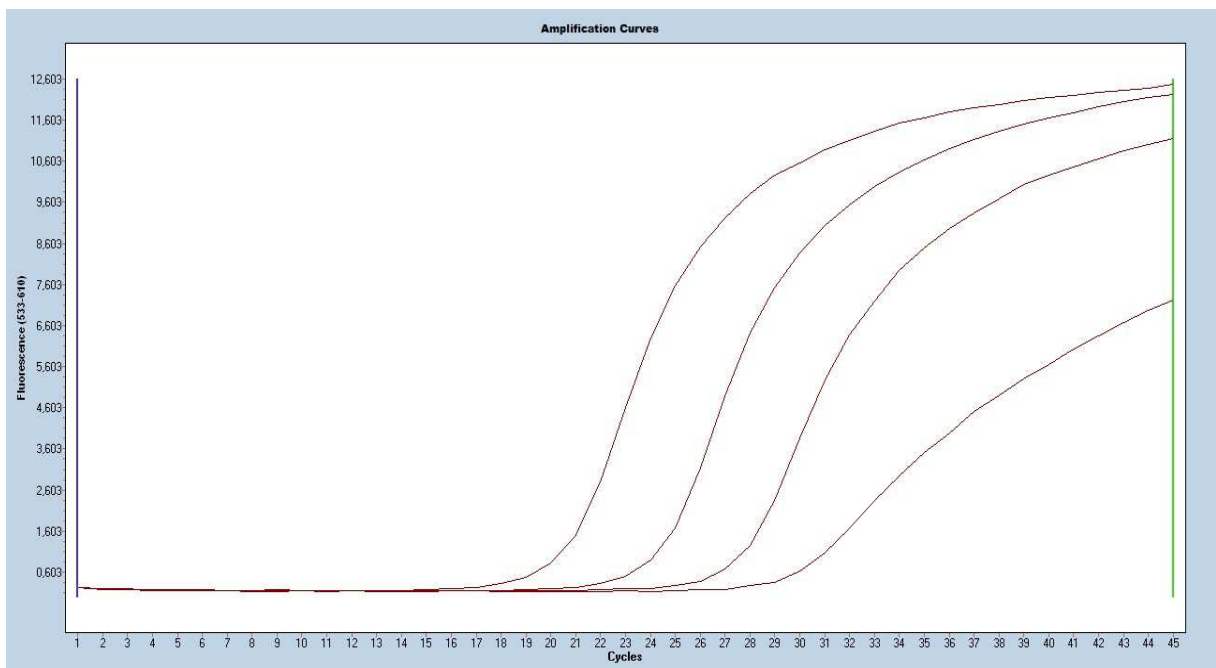


**Fig. 5:** Dilución seriada de *Dientamoeba fragilis* ( $10^5 - 10^2$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II

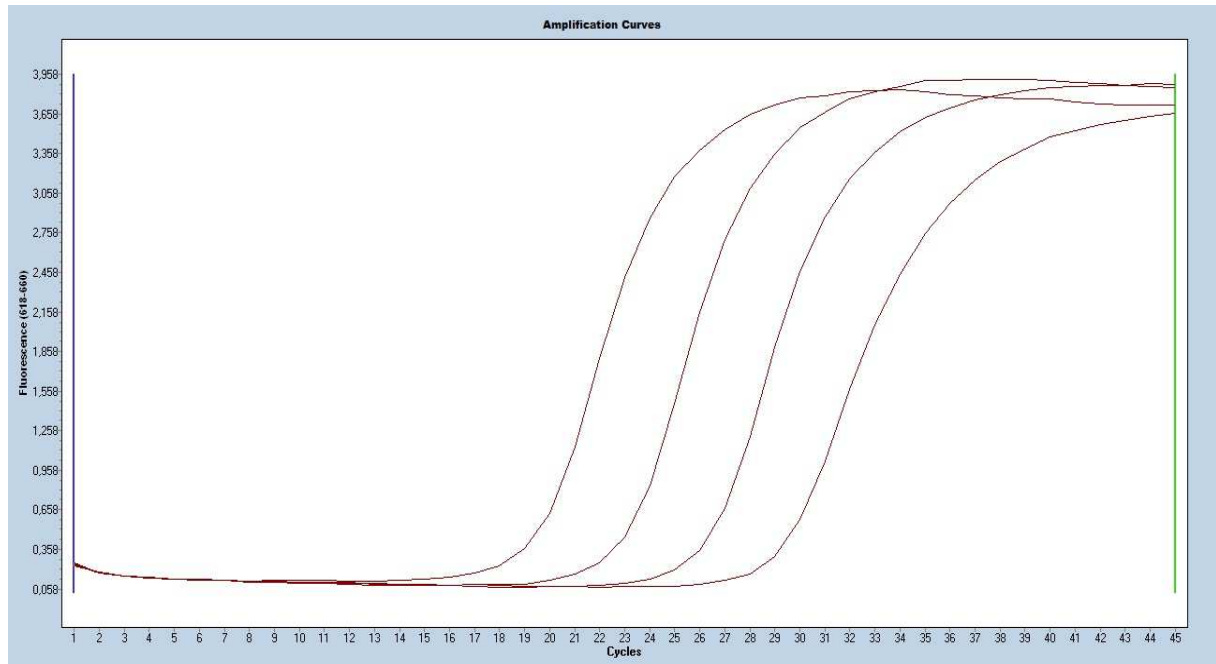




**Fig. 6:** Dilución seriada de *Giardia lamblia* ( $10^5 - 10^2$  copias de ADN/ $\mu$ l) en el LightCycler 480II



**Fig. 7:** Dilución seriada de *Entamoeba histolytica* ( $10^5 - 10^2$  copias de ADN/ $\mu$ l) en el LightCycler® 480II



**Fig. 8:** Dilución seriada de *Cryptosporidium* spp. ( $10^5$ –  $10^2$  copias de ADN/ $\mu$ 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 I es específica para *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12):

**Tabla 12:** Ensayos de reactividad cruzada

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

### 13.3 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I se evaluó con *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium* spp. (consulte la tabla 13). Todas las cepas de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium* spp. evaluadas fueron detectadas por el ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I 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
2019-04-09	Revisión general 4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 7. Precauciones para los usuarios 8. Obtención y almacenamiento de muestras 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 11. Interpretación de los resultados 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. Bibliografía

1. Centers for Disease Control and Prevention 2011. Giardia Epidemiology & Risk Factors, <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>. Aufgerufen am 10.07.2012.
2. Food and Drug Administration (FDA) 2011. Bad Bug Book 2nd Edition. <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/default.htm>. Aufgerufen am 10.07.2012.
3. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>. Aufgerufen am 07.03.2014.
4. Leitch GJ und Qing He. Cryptosporidiosis - an overview. J Biomed Res. 2012, 25(1): 1-16.
5. Lee JK *et al.* Prevalence of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea . Korean J Parasitol. 2005, 43(3):111-114.
6. Robert Koch Institut 2010. Kryptosporidiose (*Cryptosporidium parvum*). RKI-Ratgeber für Ärzte 2004. Aufgerufen am 24.07.2012.
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.
9. Stark D *et al.* A review of the clinical presentation of *Dientamoebiasis*. Am J Trop Med Hyg. 2010, 82(4):614-9.
10. 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.