

RIDA® UNITY Parasitic Stool Panel II

REF UN1725



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemania

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Uso previsto

Para el uso diagnóstico *in vitro*. La prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II, realizada en la plataforma RIDA®UNITY, es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de ADN de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* en muestras de heces humanas no tratadas de personas con signos y síntomas de infección gastrointestinal.

La prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II está destinada a apoyar el diagnóstico diferencial de infecciones parasitarias (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*) en pacientes con síntomas de infección gastrointestinal en relación con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan una infección parasitaria (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*) y no deben utilizarse como única base para el diagnóstico.

El producto está destinado a un uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

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

A nivel mundial, *Giardia lamblia*, también conocida como *G. intestinalis* o *G. duodenalis*, causa enfermedades diarreicas, también llamadas giardiasis. Cada año se registran unos 500,000 nuevos casos⁽¹⁾. La prevalencia de la giardiasis oscila entre el 2 % y el 7 % en los países industrializados, y entre el 20 % y el 30 % en los países en desarrollo⁽²⁾. La infección se produce por la ingestión de quistes en agua o alimentos contaminados, o por la vía fecal-oral. La giardiasis aguda se desarrolla tras un período de incubación de 15 a 30 días y suele durar de 1 a 3 semanas. Los síntomas de la infección aguda son diarrea blanda y con mal olor, dolor abdominal, hinchazón, náuseas y vómitos. Sin embargo, también hay casos crónicos e incluso portadores asintomáticos⁽³⁾.

Cryptosporidium parvum es una de varias especies del género *Cryptosporidium*. *C. parvum* y *C. hominis* son algunas de las causas más comunes de criptosporidiosis en humanos y son responsables de más de un millón de muertes al año. Sin embargo, las infecciones causadas por otras especies de *Cryptosporidium*, como *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* y *C. muris*, también pueden provocar síntomas clínicos⁽⁴⁾. En el período comprendido entre 2009 y 2017, se notificaron un total de 444 brotes de criptosporidiosis en los Estados Unidos, lo que dio lugar a 7465 casos, 287 hospitalizaciones y 1 muerte⁽⁵⁾. La infección se produce principalmente a través de la ingestión de ovocitos que contienen esporozoítos en agua y alimentos contaminados, y a través de la transmisión fecal-oral de persona a persona. Los síntomas de la criptosporidiosis van desde los casos asintomáticos hasta la diarrea acuosa grave, así como el dolor abdominal, las náuseas y la fiebre. La dosis de infección a la que se infectan el 50 % de las personas expuestas es baja, entre 10 y 1000 ovocitos. En las personas

inmunocompetentes, los síntomas duran en total entre 1 y 2 semanas. Las personas con inmunodeficiencias, como los pacientes con VIH, pueden experimentar un caso de criptosporidiosis mucho más grave, más largo y potencialmente mortal⁽⁴⁾. En estos casos, la evolución de la enfermedad depende del grado de debilidad del sistema inmunitario^(6,7).

Entamoeba histolytica es la única especie patógena para el ser humano del género *Entamoeba* y causa infecciones del tracto gastrointestinal, que también se denominan amebiasis. La infección se produce por vía fecal-oral a través de la ingestión de quistes en agua y alimentos contaminados, pero también puede transmitirse de persona a persona^(8, 9). Cada año se producen unos 50 millones de infecciones, que provocan entre 40,000 y 110,000 muertes⁽⁸⁾. Alrededor del 90 % de las infecciones son asintomáticas. En los casos sintomáticos, los síntomas pueden desarrollarse en un plazo de 2 a 4 semanas e incluyen diarrea, dolor abdominal y fiebre, así como enfermedades graves, como el granuloma amebiano (ameboma), que se define como una masa que se forma en el colon⁽⁹⁾.

3. Principio del ensayo

El ensayo RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* en muestras de heces humanas. El procesamiento está totalmente automatizado con el sistema RIDA®UNITY. En primer lugar, se extraen los ácidos nucleicos utilizando el RIDA®UNITY Universal Extraction Kit y el Internal Control Kit.

La secuencia diana se detecta siempre en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso (incluso con los ensayos de ADN), donde la transcripción inversa (RT) y la posterior PCR se realizan en un vial de reacción. Durante el proceso, el ARN aislado (si está presente) se transcribe a ADNc mediante transcriptasa inversa. A continuación, se amplifican los fragmentos de genes específicos de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* (ITS1-18S) mediante PCR en tiempo real.

Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la Taq polymerase separa al indicador del 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 con la cantidad de amplicones formados. El RIDA®UNITY Internal Control Kit debe utilizarse al mismo tiempo para poder comprobar la preparación de las muestras o la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.*

Tabla 1: Reactivos suministrados

REF	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
UNZ1725RM	Reaction Mix	1 x	1935 µL	amarillo, listo para usar
UNZ1725EM	Enzyme Mix	1 x	350 µL	rojo, listo para usar
UNZ1725PC	Positive Control	1 x	200 µL	azul, listo para usar
UNZ1725NC	Negative Control	1 x	450 µL	blanco, listo para usar

* Con el uso repetido y en series más pequeñas, el número de reacciones puede reducirse.

5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación de la tabla 2 y almacene el kit directamente después de su uso, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a una temperatura de entre -16 °C y -28 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. La garantía de calidad deja de ser válida después de la fecha de caducidad.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a una temperatura de 2 °C - 8 °C).
- La congelación y descongelación repetida hasta 8 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de conservación	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-16 °C a -28 °C	Puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada.
abierto	-16 °C a -28 °C	8 ciclos de congelación y descongelación

6. Reactivos necesarios no suministrados

La prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time RT-PCR está pensada exclusivamente para su uso con el sistema RIDA®UNITY. Los siguientes productos son absolutamente necesarios para un uso correcto del kit:

6.1 Reactivos

Los siguientes reactivos son necesarios para realizar la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II:

Reactivos	Número de artículo
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo es necesario para realizar la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II:

Equipo
Sistema RIDA®UNITY; referencia: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Consumibles RIDA®UNITY (puntas, placas, viales de reacción, películas). Consulte las instrucciones de uso del sistema RIDA®UNITY, información sobre pedidos de consumibles.
Mezclador vórtex
Centrífuga de sobremesa
Guantes desechables sin talco
Termociclador externo (posible mejora del sistema)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

El kit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II puede utilizarse junto con otros termocicladores compatibles. El usuario debe verificar/validar los equipos alternativos de PCR en tiempo real. Póngase en contacto con R-Biopharm AG en pcr@r-biopharm.de para comprobar la compatibilidad.

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Para el uso diagnóstico *in vitro*.

Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio cualificado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre las instrucciones de uso al llevar a cabo esta prueba.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microbios y nucleasas (DNasa/RNasa).

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

No intercambie ni mezcle los componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) de un lote de un kit con los componentes de otro lote.

El kit de ensayo puede utilizarse durante 8 semanas después de su primera apertura (el kit puede recargarse hasta 6 veces). No utilice el kit de ensayo después de la fecha de caducidad. Estas especificaciones también son comprobadas por el sistema RIDA®UNITY.

Los usuarios son responsables de desechar de manera correcta todos los reactivos y materiales una vez utilizados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Encontrará más detalles sobre la hoja de datos de seguridad (Safety Data Sheet, SDS) con el número de artículo en <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para los usuarios de la Unión Europea: notificar todos los efectos adversos graves asociados al producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Se recomienda utilizar material de muestra fresco para lograr el mejor rendimiento posible del ensayo RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II.

Evite congelar y descongelar repetidamente la muestra.

No recoja las muestras de heces en recipientes de transporte que contengan medios con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes, porque estas sustancias pueden interferir con las pruebas RIDA®UNITY.

Se recomienda preparar alícuotas de las muestras para evitar la descongelación y congelación repetidas. Las muestras congeladas deben descongelarse inmediatamente antes de la extracción para evitar la degradación de los ácidos nucleicos.

Siga las instrucciones de almacenamiento de muestras de las tablas 3 y 5.

Tabla 3: Almacenamiento de muestras - detección de *Giardia lamblia*

Muestras nativas, heces		
20 °C - 25 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 días	≤ 7 días	≤ 6 meses

En eluido		
30 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C / -80 °C, la congelación/descongelación repetida de las muestras hasta 5 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C, la congelación/descongelación repetida del eluido hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

Tabla 4: Almacenamiento de muestras - detección de *Entamoeba histolytica*

Muestras nativas, heces			
20 °C - 25 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C	-80 °C
-	≤ 7 días	≤ 3 meses	≤ 6 meses

En eluido		
30 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

A una temperatura de almacenamiento de -80 °C, la congelación/descongelación repetida de la muestra hasta 3 veces no afecta a las propiedades de la prueba. Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras a -20 °C para estos analitos.

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C, la congelación/descongelación repetida del eluido hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

Tabla 5: Almacenamiento de muestras - detección de *Cryptosporidium* spp.

Muestras nativas, heces			
20 °C - 25 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C	-80 °C
< 1 día	≤ 7 días	≤ 3 meses	≤ 6 meses

En eluido		
30 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

El analito *Cryptosporidium* spp. es estable tras la congelación/descongelación repetida de la muestra de heces a -80 °C durante cinco ciclos de congelación/descongelación y a -20 °C durante tres ciclos de congelación/descongelación.

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C, la congelación/descongelación repetida del eluido hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

8.1 Preparación del ADN a partir de muestras de heces

Para aislar el ADN de las muestras de heces, utilice el RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Siga los procedimientos correctos en las instrucciones de uso del RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (Sección: Preparación de ácido nucleico a partir de muestras de heces; Sección: Preparación de ácido nucleico a partir de muestras de heces).

9. Ejecución de la prueba

Coloque tanto las muestras como los reactivos del kit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II en el sistema RIDA®UNITY al inicio de su uso.

Previamente, mezcle de manera apropiada la **Reaction Mix**, el **Negative Control** y el **Positive Control** utilizando un mezclador vórtex. No agite en un mezclador vórtex la **Enzyme Mix**. Después, centrifugue brevemente todos los componentes.

Los tubos de PCR para las muestras a examinar deben colocarse previamente en el termociclador de PCR integrado.

Existen soportes para cargar correctamente el sistema con reactivos y consumibles. Para el proceso de carga, siga las instrucciones del sistema RIDA®UNITY. Observe las secciones correspondientes del manual del sistema RIDA®UNITY (Sección: Realización de un análisis).

La prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II solo puede utilizarse en combinación con el RIDA®UNITY Internal Control Kit. Esto permite el reconocimiento temprano de la inhibición potencial de la PCR, la verificación de la integridad de los reactivos y la confirmación de la extracción exitosa de ácidos nucleicos. El procedimiento se describe en las instrucciones de uso del RIDA®UNITY Internal Control Kit (Sección: Realización de la prueba).

El procesamiento automatizado se describe en el manual del sistema RIDA®UNITY (Sección: Realización de un análisis).

9.1 Configuración del dispositivo

9.1.1 Perfil universal por PCR en tiempo real

Para armonizar los ensayos RIDA®UNITY, el ensayo RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II se verificó exclusivamente en el perfil universal. Esto permite combinar los ensayos de ADN y ARN entre sí. En términos generales, la transcripción inversa es lo primero en el perfil universal.

Tabla 6: Perfil universal por PCR en tiempo real para RIDA®UNITY

<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	Tiempo de almacenamiento

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en el CFX96™ Dx

<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	Tiempo de almacenamiento

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

9.2 Configuración del canal de detección

Tabla 8: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	Canal SEEK Giardia
	Control interno	HEX	Canal SEEK ICD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	Canal SEEK Enta
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	Canal SEEK Crypto
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	Canal SEEK Giardia
	Control interno	VIC	Canal SEEK ICD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	Canal SEEK Enta
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	Canal SEEK Crypto

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

Las muestras se evalúan con el software analítico RIDA®SEEK del sistema RIDA®UNITY. El **Negative Control** y el **Positive Control** deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 9).

El **Positive Control** está presente en una concentración de 10^3 copias/ μ L. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 copias en cada corrida de PCR.

El **Negative Control** ya contiene el control interno RIDA®UNITY. Como los controles no contienen una plantilla, no hay que prever ninguna señal en los canales de destino. Las señales positivas en el canal IC con el que se detecta el control interno son esenciales (consulte la tabla 9).

Tabla 9: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	IC Ct	Ct de genes diana
Control positivo	+	N/A*	Ver el certificado de análisis (Certificate of Analysis, CoA)
Control negativo	-	Ct > 20	0

*En determinadas circunstancias, el canal IC puede tener una señal positiva en el control positivo y, por tanto, no debe evaluarse.

Si el control positivo no se detecta en el intervalo de Ct especificado pero el control negativo es válido, es necesario volver a analizar en la PCR todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, es necesario volver a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

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

Si las condiciones tampoco se cumplen después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

La evaluación y la interpretación de las muestras se realizan mediante el software analítico del sistema RIDA®UNITY, RIDA®SEEK.

Actualmente no existe ningún método de referencia o material de referencia reconocido internacionalmente para la normalización. Los materiales de control son metrologicamente trazables a los estándares internos de R-Biopharm AG basados en amplicones específicos de ADN.

Para obtener más información sobre la trazabilidad metroológica, póngase en contacto con R-Biopharm AG.

Los valores especificados, los rangos y otros detalles se encuentran en el certificado de análisis (Certificate of Analysis, CoA).

Tabla 10: Interpretación de los resultados*

Detección de			ICD	Resultado
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium spp.</i>		
+	-	-	+/-	<i>Giardia lamblia</i> detectable
-	+	-	+/-	<i>Entamoeba histolytica</i> detectable
-	-	+	+/-	<i>Cryptosporidium spp.</i> detectable
+	+	-	+/-	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> detectables
+	-	+	+/-	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i> detectables
-	+	+	+/-	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i> detectables
+	+	+	+/-	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> detectables
-	-	-	+	Genes diana no detectables
-	-	-	-	No válido

*+ = positivo

- = negativo

Una muestra es positiva si el ADN de la muestra y el Internal Control presentan señal de amplificación en el sistema de detección.

Una muestra también es positiva si el ADN de la muestra presenta señal de amplificación pero no se observa ninguna señal de amplificación para el Internal Control en el sistema de detección. La detección del Internal Control no

es necesaria en este caso debido a que las concentraciones altas de amplicón pueden dar lugar a una señal débil o ausente del **Internal Control**.

Una muestra es negativa si el ADN de la muestra no presenta señal de amplificación pero se observa una señal de amplificación para el **Internal Control** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR y la extracción previa se pueden excluir por la detección del **Internal Control**.

Una muestra no es válida si el ADN de la muestra y el **Internal Control** no muestran una señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción.

12. Limitaciones del método

1. La prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II detecta el ADN de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* en muestras de heces humanas no tratadas. Este ensayo no permite derivar una conexión entre el valor Ct determinado y la ocurrencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con los síntomas clínicos completos.
2. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre deben tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
3. Esta prueba está aprobada únicamente para el procesamiento automático mediante el sistema RIDA®UNITY.
4. Este ensayo solo está verificado para muestras de heces.
5. Cuando se utilice la matriz de cultivo, no se debe transferir el medio de agar a la reacción de PCR, ya que esto puede provocar posibles interferencias.
6. El muestreo, transporte, almacenamiento y manipulación inadecuados o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica de la prueba pueden dar lugar a resultados falsos negativos.
7. La presencia de inhibidores de PCR puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos.
8. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse una concentración sumamente baja de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LoD 95 %). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
9. Las mutaciones o polimorfismos en los sitios de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas y pueden dar lugar a resultados negativos falsos al usar la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II.
10. Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Una prueba positiva indica la presencia de fragmentos de genes específicos para *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* (ITS1-18S).
11. Este ensayo debe realizarse de conformidad con la normativa de las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los usuarios deben seguir atentamente las instrucciones del fabricante al realizar la prueba.

13. Características de rendimiento

13.1 Características de rendimiento clínico

La prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR se comparó en un laboratorio externo con una prueba de referencia con marca CE basada en 278 muestras de heces de pacientes con síntomas de infección gastrointestinal.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad en la detección de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp.* utilizando el kit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II.

Tabla 11: Detección de *Giardia lamblia*

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II - <i>Giardia lamblia</i>	Positivo	77	1	78
	Negativo	8	192	200
	Total	85	193	278

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	90,6 % (82,3 % - 95,8 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	99,5 % (97,1 % - 100 %)

Tabla 12: Detección de *Entamoeba histolytica*

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II - <i>Entamoeba histolytica</i>	Positivo	70	1	71
	Negativo	7	200	207
	Total	77	201	278

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	90,9 % (82,2 % - 96,3 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	99,5 % (97,3 % - 100 %)

Tabla 13: Detección de *Cryptosporidium* spp.

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II - <i>Cryptosporidium</i> spp.	Positivo	74	1	75
	Negativo	1	202	203
	Total	75	203	278

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	98,7 % (92,8 % - 100 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	99,5 % (97,3 % - 100 %)

13.2 Características de rendimiento analíticas

13.2.1 Límite de detección (LoD 95 %)

Se midió una muestra de control positivo (muestras de heces negativas, enriquecidas o usando una muestra de cultivo) en cinco pasos de dilución (en pasos de 0,25 log) para cada objetivo con 20 réplicas por paso en un lote para determinar el LoD (límite de detección). A continuación, se realizó un análisis probit. A continuación, se confirmó el LoD calculado con 20 réplicas por objetivo para el paso de dilución/concentración calculado.

Se utilizaron las siguientes cepas para las pruebas:

- *Cryptosporidium* spp. a partir de un conjunto de muestras de heces clínicas positivas (MF171865 y MF172060); concentración inicial desconocida; intervalo de Ct 24-25
- *Giardia lamblia* a partir de un conjunto de muestras de heces clínicas positivas (34544905 y 34504696); concentración inicial desconocida; intervalo de Ct 29-30
- *Entamoeba histolytica* CF (ATCC® 30015™); concentración inicial 2,7 x 10⁶ células/mL

Se determinó el siguiente límite de detección para la detección del ADN de *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* utilizando el ensayo RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II en el sistema UNITY

Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Resultados del límite de detección de la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II para los parámetros *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*.

	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
LoD	1,68E-2 factor de dilución** (Ct 35,34 ± 0,72)	9,53 células/mL	1,98E-2 factor de dilución* (Ct 36,18 ± 2,05)

* Dilución relativa de la concentración de la solución madre. Muestra clínicamente positiva con concentración inicial Ct 24-25

** Dilución relativa de la concentración de la solución madre. Muestra clínicamente positiva con concentración inicial Ct 29-30

El LoD para *Giardia lamblia* en muestras de heces se identificó con un factor de dilución de 1,68E-2.

El LoD para *Entamoeba histolytica* en las muestras de heces se determinó en 9,53 células/mL.

El LoD para *Cryptosporidium* spp en muestras de heces se identificó con un factor de dilución de 1,98E-2.

Para el flujo de trabajo mejorado utilizando el CFX96™ Dx, estos valores de LoD se confirmaron bajo el supuesto de que nos mantenemos en un rango de LoD de 2-3 veces.

13.2.2 Especificidad analítica

Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. Por lo tanto, se investigaron los efectos de diversas sustancias que pueden existir dado su uso generalizado para las infecciones gastrointestinales o la ocurrencia generalizada en las muestras correspondientes.

Las sustancias que podrían influir significativamente en los resultados de las pruebas se examinaron inicialmente a altas concentraciones (el triple de la dosis diaria o la simulación del peor caso) en un cribado de interferencia.

No se identificó interferencia para las sustancias enumeradas en la tabla 15.

Tabla 15: Sustancias potencialmente interferentes

Sustancia potencialmente interferente	Concentración
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg tabletas recubiertas con película (azitromicina)	0,75 % [p/v]
Edulcorante líquido Cologran® (sacarina + ciclamato)	1,3 % [p/v]
Sangre humana	5 % [v/v]
Tabletas de carbón vegetal 250mg (carbón vegetal)	6 % [p/v]
Mucinas	5 % [p/v]
Ácido esteárico/palmítico	40 % [p/v]

Reacciones cruzadas

Se investigaron diversos organismos (bacterias, parásitos, hongos y virus) que pueden encontrarse en la matriz de las heces. Los microorganismos a investigar para este ensayo se eligieron porque, o bien están presentes de forma natural en las muestras de heces, o bien causan los síntomas correspondientes como patógenos gastrointestinales. Para los análisis se utilizaron cultivos bacterianos (entre 10^6 y 10^9 CFU/mL) o cultivos fúngicos o virales, sobrenadantes de cultivos virales, aislados y estándares de LGC de los microorganismos en cuestión.

La prueba RIDA[®]UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR es específica para *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*. No se detectó reactividad cruzada con las siguientes especies (consulte la tabla 16):

Tabla 16: Microorganismos con posible reactividad cruzada.

Microorganismo	Resultados de la prueba*		
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	-	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	-	-
Astrovirus	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-
Coxsackievirus B4	-	-	-

<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
Ecovirus tipo 11	-	-	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
Enterovirus tipo 71	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GI	-	-	-
Norovirus GII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-

* - = negativo

13.2.3 Precisión

La precisión de la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II real-time PCR se determinó para los siguientes niveles de consideración.

Precisión intraensayo: determinación de 5 muestras de control con 20 réplicas cada una en el RIDA®UNITY en condiciones idénticas.

Precisión interensayo: determinación de 5 muestras de control en 20 corridas por duplicado en 10 días de trabajo (2 corridas por día) realizadas por técnicos diferentes en condiciones reproducibles.

las pruebas de precisión intra e interensayo se llevaron a cabo con tres lotes diferentes.

Los coeficientes de variación obtenidos para cada medición utilizando la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II real-time PCR en el RIDA®UNITY y el CFX96™ Dx fueron del 5,06 %.

Tabla 17: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II para *Giardia lamblia* a partir de muestras de heces (sistema RIDA®UNITY).

Valor medio de Ct/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote	
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit	
1	Ct	-	-	-	-	-	-	
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
2	Ct	34,3	34,5	34,0	35,0	34,8	35,2	35,0
	CV (%)	2,40 %	1,73 %	1,60 %	2,38 %	2,22 %	2,23 %	2,31 %
3	Ct	34,9	35,2	34,2	35,5	35,2	35,3	35,3
	CV (%)	2,14 %	1,88 %	2,28 %	3,05 %	2,29 %	2,50 %	2,63 %
4	Ct	33,1	33,4	33,2	33,0	33,0	33,0	33,0
	CV (%)	1,67 %	1,60 %	1,45 %	1,96 %	1,93 %	2,01 %	1,97 %
5	Ct	33,3	33,7	33,6	33,8	33,6	33,6	33,0
	CV (%)	1,73 %	1,74 %	1,46 %	1,82 %	1,91 %	1,81 %	1,97 %

Tabla 18: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II para *Giardia lamblia* a partir de muestras de heces (CFX96™ Dx).

Valor medio de Ct/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	35,0	35,5	34,9	35,3	35,1	35,2
	CV (%)	2,76 %	1,86 %	2,51 %	1,97 %	2,26 %	2,27 %
3	Ct	35,8	35,8	35,3	35,5	35,3	35,2
	CV (%)	2,83 %	2,52 %	2,32 %	2,56 %	2,41 %	2,57 %
4	Ct	33,2	33,2	33,3	32,9	32,9	32,8
	CV (%)	2,08 %	2,18 %	2,16 %	2,10 %	1,54 %	1,64 %
5	Ct	34,1	34,7	33,7	33,7	33,6	33,6
	CV (%)	1,81 %	1,88 %	2,39 %	1,77 %	1,90 %	1,79 %

Tabla 19: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II para *Entamoeba histolytica* a partir de muestras de heces (sistemaRIDA®UNITY).

Valor medio de Ct/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	31,9	32,2	32,1	34,5	34,3	34,5
	CV (%)	5,46 %	1,30 %	1,29 %	3,33 %	2,86 %	3,68 %
3	Ct	31,5	31,9	30,4	33,6	33,5	33,6
	CV (%)	2,14 %	1,89 %	3,16 %	2,81 %	3,24 %	3,53 %
4	Ct	29,7	30,4	30,0	30,7	30,7	30,8
	CV (%)	0,85 %	0,87 %	1,34 %	1,94 %	1,69 %	2,02 %
5	Ct	31,3	32,8	32,6	31,9	31,8	31,9
	CV (%)	3,21 %	4,73 %	2,47 %	2,60 %	2,23 %	2,71 %

Tabla 20: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II para *Entamoeba histolytica* de muestras de heces (CFX96™ Dx).

Valor medio de Ct/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote	
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit	
1	Ct	-	-	-	-	-	-	
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
2	Ct	32,4	32,8	32,2	33,9	33,8	33,7	33,8
	CV (%)	2,12 %	2,21 %	2,12 %	2,63 %	3,02 %	3,00 %	2,89 %
3	Ct	31,7	31,7	31,3	33,0	32,9	32,7	32,9
	CV (%)	2,02 %	1,71 %	1,95 %	3,16 %	2,55 %	2,71 %	2,82 %
4	Ct	30,0	29,6	29,5	30,4	30,5	30,4	30,5
	CV (%)	0,60 %	0,76 %	0,72 %	1,98 %	1,63 %	1,79 %	1,81 %
5	Ct	32,6	33,3	32,0	31,3	31,4	31,3	31,3
	CV (%)	2,09 %	3,68 %	2,23 %	2,01 %	1,78 %	1,58 %	1,80 %

Tabla 21: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II para *Cryptosporidium* spp. a partir de muestras de heces (sistema RIDA®UNITY).

Valor medio de Ct/CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	31,5	32,9	33,3	32,0	34,7	34,3	33,7
	CV (%)	2,25 %	1,61 %	1,41 %	1,83 %	3,15 %	2,74 %	5,06 %
3	Ct	33,8	35,0	34,4	32,8	35,4	35,0	34,4
	CV (%)	2,92 %	2,31 %	1,95 %	2,42 %	3,27 %	3,40 %	5,03 %
4	Ct	27,3	28,1	28,3	26,6	28,8	28,6	28,0
	CV (%)	0,70 %	1,15 %	0,90 %	1,41 %	2,86 %	2,60 %	4,94 %
5	Ct	28,5	29,7	29,5	27,2	29,4	29,3	28,6
	CV (%)	0,70 %	1,04 %	0,94 %	1,57 %	2,82 %	2,47 %	4,84 %

Tabla 22: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II para *Cryptosporidium spp.* a partir de muestras de heces (CFX96™ Dx).

Valor medio de Ct/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	30,5	32,3	31,8	32,4	34,2	34,3
	CV (%)	1,81 %	2,07 %	1,23 %	2,93 %	2,97 %	2,58 %
3	Ct	31,8	32,9	34,6	33,5	34,6	34,7
	CV (%)	3,68 %	1,53 %	1,84 %	3,38 %	2,90 %	2,75 %
4	Ct	27,0	28,1	28,2	27,2	28,6	28,6
	CV (%)	0,78 %	1,02 %	0,93 %	2,20 %	2,87 %	2,21 %
5	Ct	28,3	29,4	29,4	27,7	29,1	29,0
	CV (%)	0,83 %	0,72 %	0,91 %	1,64 %	2,75 %	1,91 %

13.2.4 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR se examinó en un panel definido de parásitos (consulte la tabla 23).

Tabla 23: Pruebas de reactividad analítica

Cepa	Resultado*		
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Giardia lamblia</i> **	+	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** Portland 1	+	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** WB Clon C6	+	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	+	-
<i>Cryptosporidium parvum</i> (aislado)	-	-	+
<i>Cryptosporidium parvum</i> (ADN artificial)	-	-	+
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	+
<i>Cryptosporidium hominis</i>	-	-	+

*+ = positivo (al menos 2 de 3 réplicas positivas)

- = negativo










** *Giardia intestinalis* y *Giardia lamblia* son el mismo microorganismo.

14. Historial de versiones





Número de versión	Sección y designación
2022-09-13	Versión de lanzamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Siga las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservación
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Mezcla de reacción
	Mezcla enzimática
	Control negativo
	Control positivo

16. Bibliografía

1. Escobedo AA, Hanevik K, Almirall P, Cimerman S, Alfonso M. Management of chronic Giardia infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(9):1143-57.
2. Dixon B. Giardia duodenalis in humans and animals - Transmission and disease. 2020.
3. Bialek R, Dostal G. Parasitosen, Mykosen, Tropen- und Reisemedizin. *Pädiatrie.* 2019:371-99. German. doi: 10.1007/978-3-662-57295-5_16. PMID: PMC7498386.
4. Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of Cryptosporidium species. *Acta Trop.* 2018;184:1-14.
5. Dong S, Yang Y, Wang Y, Yang D, Yang Y, Shi Y, et al. Prevalence of Cryptosporidium Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitol.* 2020;65(4):882-9.
6. T. Löscher und G.D. Burchard (Hrsg.): Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin. 4. Aufl., Thieme, Stuttgart; New York, 2010, S. 655-659.
7. Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie (Hrsg.): DGPI Handbuch. Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. 6. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, 2013
8. Salami A, Fakh H, Chakkour M, Salloum L, Bahmad HF, Ghseini G. Prevalence, risk factors and seasonal variations of different Enteropathogens in Lebanese hospitalized children with acute gastroenteritis. *BMC Pediatr.* 2019;19(1):137.
9. Custodio H. Protozoan Parasites. *Pediatr Rev.* 2016;37(2):59-69; quiz 70-1.