

Vitassay qPCR

Blastocystis hominis + Dientamoeba fragilis

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis*, permite la detección y diferenciación de *Blastocystis hominis* y *Dientamoeba fragilis* mediante PCR a tiempo real en muestras de heces humanas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por *Blastocystis hominis* y/o *Dientamoeba fragilis*.

Referencias

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* 4x8-well strip, low profile
7041030

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* 4x8-well strip, high profile
7042030

Materiales/Reactivos suministrados

| Código | Reactivo/Material | Color | Cantidad |
|-----------------------|---|----------|-----------------------|
| 7041S030/ 7042S030 | <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Dientamoeba fragilis</i> strips low/high profile | - | 4 tiras de 8 pocillos |
| 7C030 | <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Dientamoeba fragilis</i> Positive Control | rojo | 1 vial |
| 7001A | PCR grade water | blanco | 1 vial x 1 mL |
| 7002B | Resuspension buffer | verde | 1 vial x 1,8 mL |
| 7003N | Negative control | amarillo | 1 vial x 1 mL |
| 7004O | Tapas ópticas | - | 4 tiras de 8 tapones |

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Las bacterias *Blastocystis hominis* y *Dientamoeba fragilis* se encuentran juntas frecuentemente. Ambas están relacionadas con síntomas como: dolor abdominal, hinchazón, calambres, incomodidad, náuseas o cambios en los hábitos intestinales parecidos a los del síndrome de intestino irritable. Aunque *Dientamoeba fragilis* puede aparecer de forma sintomática o asintomática, cuando aparece de forma sintomática puede ser ignorada debido a su aparición conjunta con otros patógenos causantes de los mismos síntomas. En el caso de *Blastocystis hominis* realmente no existe un estudio que demuestre si se trata de un patógeno, bacterias comensales o un patógeno circunstancial. Además, recientemente, varios grupos de *Blastocystis* han sido aislados de humanos, cada uno procedente de un anfitrión distinto, siendo estos: *B. galli* (de pollos), *B. anatis* (de patos), *B. anseri* (de gansos) and *B. lapemi* (de serpientes marinas). Esto establece la posibilidad de que más de una especie de *Blastocystis* sea capaz de infectar humanos. Aunque el principal problema a la hora de determinar si *Blastocystis hominis* es un patógeno o no, radica en el desconocimiento de si otros patógenos concomitantes realmente lo son. Se cree que tanto *Blastocystis* como *Dientamoeba* se transmiten a través de la vía fecal-oral. La característica principal de *Dientamoeba fragilis* es su núcleo binucleado, además de sus dos genotipos para SSU rDNA, siendo estos: genotipo 1 y genotipo 2. Aunque, debido a la naturaleza frágil de *Dientamoeba fragilis*, su estructura binucleada es difícilmente apreciable en preparaciones salinas. Además, una vez degeneran sus trofozoitos, se vuelven difícilmente reconocibles. Sin embargo, la PCR en Tiempo Real ha demostrado una excelente sensibilidad y especificidad frente a *Dientamoeba fragilis* y *Blastocystis hominis* a través de los genes diana 5,8S rRNA y 18S RNA, respectivamente.

Principio del test

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región diana conservada del gen 5,8S rRNA para *Blastocystis hominis* y 18S rRNA para *Dientamoeba fragilis*. Tras la extracción de DNA, la presencia de *Blastocystis hominis* y/o *Dientamoeba fragilis* se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis*, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal FAM (*Dientamoeba fragilis*) y ROX (*Blastocystis hominis*) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA.

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (Mobio).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Blastocystis hominis + Dientamoeba fragilis Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

| Etapa | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|--|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95°C | 2 min | 1 |
| Desnaturalización | 95°C | 10 seg | 45 |
| Hibridación/Elongación (Recogida de datos*) | 60°C | 50 seg | |

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (*Dientamoeba fragilis*), ROX (*Blastocystis hominis*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de *Dientamoeba fragilis* (FAM) y *Blastocystis hominis* (ROX).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de ROX y FAM.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:

| <i>Blastocystis hominis</i> (ROX) | <i>Dientamoeba fragilis</i> (FAM) | Control Interno | Control Negativo | Control Positivo | Interpretación |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------------|------------------|--|
| + | + | +/- | - | + | <i>Blastocystis hominis</i> y <i>Dientamoeba fragilis</i> Positivos |
| - | - | + | - | + | <i>Blastocystis hominis</i> y <i>Dientamoeba fragilis</i> Negativos |
| + | - | +/- | - | + | <i>Blastocystis hominis</i> Positivo, <i>Dientamoeba fragilis</i> Negativo |
| - | + | +/- | - | + | <i>Dientamoeba fragilis</i> Positivo, <i>Blastocystis hominis</i> Negativo |
| + | + | + | + | + | Inválido |
| - | - | - | - | - | Inválido |

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todos los parásitos no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Un total de 299 muestras fecales humanas fueron analizadas mediante Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis*, RIDA@GENE *Dientamoeba fragilis* (r-Biopharm) y un diagnóstico de rutina en paralelo de parásitos utilizando microscopia para *Blastocystis hominis* y/o *Dientamoeba fragilis*.

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* detectó *Blastocystis hominis* en 47 muestras positivas, 23 de las cuales fueron evaluadas y confirmadas como positivas mediante microscopia.

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* detectó *Dientamoeba fragilis* en 79 muestras positivas, 72 de las cuales se evaluaron mediante PCR-*in house*, de las cuales 69 muestras dieron resultados positivos para *Dientamoeba fragilis*. Además, 45 muestras se evaluaron y confirmaron como positivas por el kit comercial RIDA@GENE *Dientamoeba fragilis* (r-Biopharm).

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Blastocystis hominis* y *Dientamoeba fragilis* utilizando el kit Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis*.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes parásitos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *Blastocystis hominis* y *Dientamoeba fragilis* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos.

No se observaron reacciones cruzadas de *Blastocystis hominis* y *Dientamoeba fragilis* entre ninguna de las especies:

| Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada | | |
|--|--|--|
| <i>Shigella flexneri</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 |
| <i>Salmonella typhi</i> | <i>Citrobacter freundii</i> | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | <i>Bacteroides fragilis</i> |
| <i>Salmonella paratyphi B</i> | <i>Serratia liquefaciens</i> | Adenovirus serotipo 40 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Adenovirus serotipo 41 |
| <i>Salmonella bongori</i> | <i>Clostridium difficile</i> | Rotavirus A |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | Norovirus Genotipo I y II |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i> | <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> | Astrovirus Genotipo I-VIII |
| <i>Salmonella pullorum</i> | <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i> | <i>Campylobacter lari</i> |
| <i>Salmonella gallinarum</i> | <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Campylobacter fetus</i> |
| <i>Helicobacter pylori</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Campylobacter coli</i> |
| <i>Helicobacter hepaticus</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> |
| <i>Helicobacter cinaedi</i> | <i>Arcobacter butzleri</i> | <i>Campylobacter upsaliensis</i> |
| <i>Helicobacter heilmannii</i> | <i>Giardia intestinalis</i> | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Entamoeba histolytica</i> | |

Reactividad analítica

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* Real Time PCR para *Blastocystis hominis* ha sido evaluado frente a *Blastocystis hominis*, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* Real Time PCR para *Dientamoeba fragilis* ha sido evaluado frente a *Dientamoeba fragilis* obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis*, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)

- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)¹
- SmartCycler® (Cepheid)¹

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por *Blastocystis hominis* y *Dientamoeba fragilis*. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras fecales humanas. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes parásitos, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

| Termocicladores con bloque de bajo perfil | Termocicladores con bloque de alto perfil |
|--|---|
| Agilent Technologies | Abbott |
| AriaMx Real-Time PCR System | Abbott m2000 RealTime System |
| Applied Biosystems | Applied Biosystems |
| 7500 Fast Real-Time PCR System | 7300 Real-Time PCR System |
| 7500 Fast Dx Real-Time PCR System | 7500 Real-Time PCR System |
| QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast | 7900 HT Real-Time PCR System |
| QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast | ABI PRISM 7000 |
| QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast | ABI PRISM 7700 |
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System | QuantStudio™ 12K Flex 96-well |
| QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System | QuantStudio™ 6 Flex 96-well |
| StepOne Plus™ Real-Time PCR System | QuantStudio™ 7 Flex 96-well |
| StepOne™ Real-Time PCR System | QuantStudio™ 5 Real-Time PCR |
| ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System | QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System |
| BIONEER | ViiA™ 7 Real-Time PCR |
| Exicycler™ 96 | Analytik Jena Biometra |
| Bio-Rad | TOptical |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System | qTOWER.2.0 |
| Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System | BIONEER |
| Cepheid | Exicycler™ 96 |
| SmartCycler® | Bio-Rad |
| Qiagen | CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection |
| Rotor-Gene® Q | iCycler iQ™ Real-Time PCR |
| Roche | iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR |
| LightCycler® 480 Real-Time PCR System | MyiQ™ Real-Time PCR Detection System |
| LightCycler® 96 Real-Time PCR System | MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System |
| Cobas z480 Analyzer | Cepheid |
| | SmartCycler® |
| | DNA-Technology |
| | DTlite Real-Time PCR System* |
| | DTprime Real-time Detection Thermal Cycler* |
| | Eppendorf |
| | Mastercycler™ ep <i>realplex</i> |
| | Qiagen |
| | Rotor-Gene® Q |
| | Stratagene / Agilent Technologies |
| | Mx3000P™ Real Time PCR System |
| | Mx3005P™ Real Time PCR System |

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

| Termociclador | Canal Vitassay | Canal de Detección | Observaciones |
|--------------------------------------|----------------|--------------------|--|
| Bio-Rad CFX96™ | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| ABI 7500 Applied Biosystems | FAM | FAM | Opción del control pasivo ROX desactivada |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Roche Lightcycler®480II | FAM | 465/510 | Se requiere compensación de color |
| | HEX | 533/580 | |
| | ROX | 533/610 | |
| | Cy5 | 618/660 | |
| Smartcycler® Cepheid | FAM | Channel 1 | |
| | HEX | Channel 2 | |
| | ROX | Channel 3 | |
| | Cy5 | Channel 4 | |
| Abbott m2000rt | FAM | FAM | |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene | FAM | FAM | Opción del control pasivo ROX desactivada |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| AriaMx Agilent | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Rotor-Gene®Q Qiagen | FAM | Green | Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition". |
| | HEX | Yellow | |
| | ROX | Orange | |
| | Cy5 | Red | |
| Exicycler™ 96 BIONEER | FAM | FAM | |
| | HEX | JOE | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

| Termociclador | Canal Vitassay | Valor de exposición |
|--|----------------|---------------------|
| DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) | FAM | 500 |
| | HEX | 500 |
| | ROX | 500 |
| | Cy5 | 500 |
| DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) | FAM | 500 |
| | HEX | 1000 |
| | ROX | 1000 |
| | Cy5 | 1000 |

Intended use

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* allows the detection and differentiation of *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* by real-time PCR in human stool samples. The product is intended for use in the diagnosis of *Blastocystis hominis* and/or *Dientamoeba fragilis* infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* 4x8-well strip, low profile
7041030

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* 4x8-well strip, high profile
7042030

Materials/reagents provided

| Reference | Reagent/Material | Colour | Amount |
|-----------------------|---|--------|-----------------|
| 7041S030/ 7042S030 | <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Dientamoeba fragilis</i> strips low/high profile | - | 4x8-well strip |
| 7C030 | <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Dientamoeba fragilis</i> Positive Control | red | 1 vial |
| 7001A | PCR grade water | white | 1 vial x 1 mL |
| 7002B | Resuspension Buffer | green | 1 vial x 1,8 mL |
| 7003N | Negative control | yellow | 1 vial x 1 mL |
| 7004O | Optical caps | - | 4x8 cap strip |

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)

- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Blastocystis hominis and *Dientamoeba fragilis* are frequently encountered together. They are both associated with symptoms such as: abdominal pain, bloating, cramps, discomfort, nausea or alteration of bowel habits, resembling irritable bowel syndrome. Although *Dientamoeba fragilis* can be symptomatic or asymptomatic, when symptomatic might be ignored due to the presence of other suspect pathogens. For *Blastocystis hominis* it is truly unknown whether it is a pathogen, a commensal or a circumstantial pathogen. Recently, various groups of *Blastocystis* have been isolated from humans, each proceeding from a different host, these are: *B. galli* (from chickens), *B. anatis* (from ducks), *B. anseri* (from geese) and *B. lapemi* (from sea snakes). This has raised the possibility for more than one species of *Blastocystis* infecting humans. The principal problem when determining whether *Blastocystis hominis* is a pathogen or not, is the unknown pathogenicity of other concomitant organisms. It is believed that both *Blastocystis* and *Dientamoeba* are transmitted through the oral-fecal route. *Dientamoeba fragilis* is characterized for having a binucleate nucleus and two SSU rDNA genotypes, genotype 1 and genotype 2. Given the fragile nature of *Dientamoeba fragilis*, the binucleate structure cannot be appreciated correctly through saline preparations. And once its trophozoites degenerate they become difficult to recognize. Real Time PCR has demonstrated excellent sensitivity and specificity when diagnosing *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis hominis*, through the targeting of the 5,8S rRNA gene and 18S RNA gene, respectively.

Principle of the test

Vitassay qPCR Blastocystis hominis + Dientamoeba fragilis test is based on the real-time amplification of a conserved region of the 5,8S rRNA gene for the identification of *Blastocystis hominis* and 18S rRNA gene for the identification of *Dientamoeba fragilis*. After DNA isolation, the presence of *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Blastocystis hominis + Dientamoeba fragilis test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the *Dientamoeba fragilis* DNA target sequence is detected through the FAM channel and *Blastocystis hominis* DNA target in ROX channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Attached II).

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit, Maxwell® 16 instrument (Promega).

QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (Mobio).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

| Step | Temperature | Time | Cycles |
|---|-------------|--------|--------|
| Initial denaturation | 95°C | 2 min | 1 |
| Denaturation | 95°C | 10 sec | 45 |
| Annealing/Extension (Data collection*) | 60°C | 50 sec | |

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*Dientamoeba fragilis*), ROX (*Blastocystis hominis*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (*Dientamoeba fragilis*) and ROX (*Blastocystis hominis*), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in ROX and FAM which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

| <i>Blastocystis hominis</i> (ROX) | <i>Dientamoeba fragilis</i> (FAM) | Internal Control | Negative Control | Positive Control | Interpretación |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|--|
| + | + | +/- | - | + | <i>Blastocystis hominis</i> and <i>Dientamoeba fragilis</i> Positives |
| - | - | + | - | + | <i>Blastocystis hominis</i> and <i>Dientamoeba fragilis</i> Negatives |
| + | - | +/- | - | + | <i>Blastocystis hominis</i> Positive, <i>Dientamoeba fragilis</i> Negative |
| - | + | +/- | - | + | <i>Dientamoeba fragilis</i> Positive, <i>Blastocystis hominis</i> Negative |
| + | + | + | + | + | Experiment fail |
| - | - | - | - | - | Experiment fail |

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

A total of 299 faecal specimens from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR Blastocystis hominis + Dientamoeba fragilis and RIDA®GENE Dientamoeba fragilis (R-biopharm) and these results were compared with those obtained by routine parallel diagnosis of parasites using microscopy for *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis*.

Vitassay qPCR Blastocystis hominis + Dientamoeba fragilis detected *Blastocystis hominis* in 47 positive samples, 23 of which were evaluated and confirmed as positive for *Blastocystis hominis* by microscopic examination.

Vitassay qPCR Blastocystis hominis + Dientamoeba fragilis detected *Dientamoeba fragilis* in 79 positive samples, 72 of them were evaluated using PCR-in house, with 69 samples showing positive result for *Dientamoeba fragilis*. In addition, 45 samples were evaluated and confirmed as positive by RIDA®GENE Dientamoeba fragilis (R-biopharm)

Vitassay qPCR Blastocystis hominis + Dientamoeba fragilis shows a high sensitivity and specificity to detect *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis*.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* was tested within the panel of different microorganisms.

No cross-reactivity of *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* was seen between any of the species:

| Cross-reactivity assay | | |
|---|--|--|
| <i>Shigella flexneri</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 |
| <i>Salmonella typhi</i> | <i>Citrobacter freundii</i> | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | <i>Bacteroides fragilis</i> |
| <i>Salmonella paratyphi B</i> | <i>Serratia liquefaciens</i> | Adenovirus serotype 40 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Adenovirus serotype 41 |
| <i>Salmonella bongori</i> | <i>Clostridium difficile</i> | Rotavirus A |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | Norovirus Genotype I y II |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i> | <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> | Astrovirus Genotype I-VIII |
| <i>Salmonella pullorum</i> | <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i> | <i>Campylobacter lari</i> |
| <i>Salmonella gallinarum</i> | <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Campylobacter fetus</i> |
| <i>Helicobacter pylori</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Campylobacter coli</i> |
| <i>Helicobacter hepaticus</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> |
| <i>Helicobacter cinaedi</i> | <i>Arcobacter butzleri</i> | <i>Campylobacter upsaliensis</i> |
| <i>Helicobacter heilmannii</i> | <i>Giardia intestinalis</i> | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Entamoeba histolytica</i> | |

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* for *Blastocystis hominis* was evaluated against *Blastocystis hominis*, showing positive results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* for *Dientamoeba fragilis* was evaluated against *Dientamoeba fragilis*, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with human faecal samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different parasites, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

| Low profile Block Thermocyclers |
|--|
| Agilent Technologies |
| AriaMx Real-Time PCR System |
| Applied Biosystems |
| 7500 Fast Real-Time PCR System |
| 7500 Fast Dx Real-Time PCR System |
| QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast |
| QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast |
| QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast |
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System |
| QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System |
| StepOne Plus™ Real-Time PCR System |
| StepOne™ Real-Time PCR System |
| ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System |
| BIONEER |
| Exicycler™ 96 |
| Bio-Rad |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System |
| Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System |
| Cepheid |
| SmartCycler® |
| Qiagen |
| Rotor-Gene® Q |
| Roche |
| LightCycler®480 Real-Time PCR System |
| LightCycler®96 Real-Time PCR System |
| Cobas z480 Analyzer |

| High profile Block Thermocyclers |
|--|
| Abbott |
| Abbott m2000 RealTime System |
| Applied Biosystems |
| 7300 Real-Time PCR System |
| 7500 Real-Time PCR System |
| 7900 HT Real-Time PCR System |
| ABI PRISM 7000 |
| ABI PRISM 7700 |
| QuantStudio™ 12K Flex 96-well |
| QuantStudio™ 6 Flex 96-well |
| QuantStudio™ 7 Flex 96-well |
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR |
| QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System |
| ViiA™ 7 Real-Time PCR |
| Analytik Jena Biometra |
| TOptical |
| qTOWER 2.0 |
| BIONEER |
| Exicycler™ 96 |
| Bio-Rad |
| CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection |
| iCycler iQ™ Real-Time PCR |
| iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR |
| MyiQ™ Real-Time PCR Detection System |
| MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System |
| Cepheid |
| SmartCycler® |
| DNA-Technology |
| DTlite Real-Time PCR System |
| DTprime Real-time Detection Thermal Cycler |
| Eppendorf |
| Mastercycler™ ep <i>realplex</i> |
| Qiagen |
| Rotor-Gene® Q |
| Stratagene / Agilent Technologies |
| Mx3000P™ Real Time PCR System |
| Mx3005P™ Real Time PCR System |

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

| REAL-TIME PCR THERMOCYCLER | Vitassay CHANNEL | DETECTION CHANNEL | OBSERVATIONS |
|--------------------------------------|------------------|-------------------|---|
| Bio-Rad CFX96™ | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| ABI 7500 Applied Biosystems | FAM | FAM | Passive reference option ROX is none |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Roche Lightcycler®480II | FAM | 465/510 | Colour Compensation required |
| | HEX | 533/580 | |
| | ROX | 533/610 | |
| | Cy5 | 618/660 | |
| Smartcycler® Cepheid | FAM | Channel 1 | |
| | HEX | Channel 2 | |
| | ROX | Channel 3 | |
| | Cy5 | Channel 4 | |
| Abbott m2000rt | FAM | FAM | |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene | FAM | FAM | Passive reference option ROX is none |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| AriaMx Agilent | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Rotor-Gene®Q Qiagen | FAM | Green | In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition". |
| | HEX | Yellow | |
| | ROX | Orange | |
| | Cy5 | Red | |
| Exicycler™ 96 BIONEER | FAM | FAM | |
| | HEX | JOE | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

| Thermocycler | Vitassay channel | Exposure values |
|--|------------------|-----------------|
| DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) | FAM | 500 |
| | HEX | 500 |
| | ROX | 500 |
| | Cy5 | 500 |
| DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) | FAM | 500 |
| | HEX | 1000 |
| | ROX | 1000 |
| | Cy5 | 1000 |

Bibliography/Bibliografía

1. Prospective Study of the Prevalence, Genotyping, and Clinical Relevance of *Dientamoeba fragilis* Infections in an Australian Population. D. Stark, et al. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; 2718-2723.
2. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: Several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. Joel L. N. Barrat, et al. *Gut Microbes*, 2011; 2:1: 3-12.
3. Emerging from Obscurity: Biological, Clinical, and Diagnostic Aspects of *Dientamoeba fragilis*. Eugene H. Johnson, et al. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004: 553-570.
4. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfillin irritable bowel syndrome criteria. Javed Yakoob, et al. *Parasitology Research*, 2010; 107: 679-684.
5. Epidemiology and Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. Patrick W. Doyle, et al. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990; 116-121.
6. Clinical Significance of *Blastocystis hominis*. S. M. Hussain Qadri, et al. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989; 2407-2409.
7. *Blastocystis hominis* Revisited. D. J. Stenzel, et al. *Clinical Microbiology Reviews*, 1996; 563-584.

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

| | | | |
|---|---|---|---|
|  | Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only |  | Almacenar en lugar seco Keep dry |
|  | Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use |  | Limitación de temperatura Temperature limitation |
|  | Fecha de caducidad Use by |  | Fabricante Manufacturer |
|  | Número de lote Lot number |  | Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test |
| DIL | Diluyente de muestra Buffer (sample diluent) |  | Número de referencia Catalogue number |



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com