

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica
for ELITe InGenius®

CE IVD



These instructions for use apply to the following references / *Estas instrucciones de uso aplican para la siguiente referencia:*

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIA
VIASURE <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®	VS-2340KGE196TE

Table A 1. References for the product to be used with ELITE InGenius®. / *Referencia del producto para ser usado con ELITE InGenius®.*

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	5
4.	Reagents provided	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	7
6.	Transport and storage conditions.....	7
7.	Precautions for users	7
8.	Test procedure	9
8.1.	Specimen collection, transport and storage	9
8.2.	Sample Preparation and DNA extraction.....	9
8.3.	Extraction control	10
8.4.	Lyophilized Positive Control	10
8.5.	Lyophilized Reaction-Mix tube.....	10
8.6.	PCR Condition	11
8.6.1.	PCR Test program for VIASURE <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.....	11
8.6.2.	ELITE InGenius® Instrument set up.....	12
9.	Result interpretation	13
10.	Limitations of the test	15
11.	Quality control	16
12.	Performance characteristics.....	17
12.1.	Clinical sensitivity and specificity.....	17
12.2.	Analytical sensitivity	17
12.3.	Analytical specificity	18
12.4.	Analytical reactivity	19
1.	Usó previsto.....	20

Contenido

2.	Introducción y explicación	20
3.	Procedimiento	20
4.	Reactivos suministrados.....	21
5.	Material requerido y no suministrado	22

6.	Condiciones de transporte y almacenamiento	22
7.	Precauciones para el usuario	23
8.	Procedimiento del test	24
8.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	24
8.2.	Preparación de la muestra y extracción de DNA	25
8.3.	Control de Extracción.....	25
8.4.	Control Positivo Liofilizado	25
8.5.	Tubo de mezcla de reacción liofilizada	25
8.6.	Condición de PCR	26
8.6.1.	Programa de prueba de PCR para VIASURE <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.....	26
8.6.2.	Configuración del instrumento ELITE InGenius®.....	28
9.	Interpretación de resultados.....	28
10.	Limitaciones del test	30
11.	Control de calidad	31
12.	Características del test	32
12.1.	Sensibilidad y especificidad clínica	32
12.2.	Sensibilidad analítica	32
12.3.	Especificidad analítica	33
12.4.	Reactividad analítica	34
	Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	35
	Trademarks.....	35

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® is an automated in-vitro diagnostic test designed for qualitative detection of *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* in human faecal samples from patients with signs and symptoms of gastrointestinal infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* in combination with clinical and epidemiological risk factors. The assay is validated in association with ELITE InGenius®, an automated and integrated system for extraction, amplification, and detection of nucleic acids. DNA is extracted from faecal specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica*.

2. Summary and Explanation

Enteric protozoa continue to be the most commonly encountered parasitic diseases affecting millions of people each year and causing significant morbidity and mortality worldwide. Among them, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, and *Giardia lamblia* are the major etiological agents.

Cryptosporidium can be acquired through person-to-person, contact with companion and farm animals, ingestion of contaminated food, drinking water and recreational water. *Cryptosporidium* can be present without symptoms or cause diarrhoea and abdominal discomfort with weight loss and malabsorption. *Giardia lamblia* infection occurs by the faecal-oral route transmission, either through direct contact or by ingestion of contaminated food or water. Diarrhoea is the major symptom of the disease, but the clinical manifestations vary; from non-symptomatic infections to severe diarrhoea, abdominal cramps, bloating and flatulence often accompanied by nausea and weight loss. *Entamoeba histolytica* disease is spread primarily by food or water contaminated with cysts but may also be transmitted from person to person by faecal-oral route. Clinical features of amoebiasis range from asymptomatic colonization (90% of the cases) to amoebic dysentery (stomach pain, nausea or vomiting and severe diarrhoea with bloody and slimy stools, fever) and invasive extraintestinal disease, most commonly in the form of liver abscesses.

Microscopy has been considered to be the gold standard method for diagnosis of these parasites. However, is time-consuming, not very sensitive and unable to distinguish the invasive pathogenic *E. histolytica* from the commensal parasite *E. dispar*. Real-time PCR assay is less labour-intensive and has higher sensitivity and specificity, making it an attractive alternative.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® is designed for the qualitative detection of DNA from *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* in faecal specimens. After DNA isolation, the identification of these pathogens is performed by the amplification of a conserved region of the 18S rRNA gene for *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* respectively, using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on ELITE InGenius®.

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an Extraction Control to monitor PCR inhibition. *Cryptosporidium* DNA targets are amplified and detected in Cy5 channel, *Giardia lamblia* DNA targets are amplified and detected in FAM channel, *Entamoeba histolytica* DNA targets are amplified and detected in ROX channel and the extraction control (EC) in HEX, VIC or JOE channel.

Target	ELITE InGenius® Channel	Compatible Fluorophore	Gene
<i>Cryptosporidium</i>	Ch 5	Cy5	18S rRNA
<i>Giardia lamblia</i>	Ch 1	FAM	18S rRNA
<i>Entamoeba histolytica</i>	Ch 4	ROX	18S rRNA
Extraction Control (EC)	Ch 2	HEX, VIC or JOE *	-

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	4 vials
Rehydration buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	2 vials x 1 mL

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® with Cat. N°. VS-2340KGE196TE.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.

- Automated sample-to-result solution dedicated to Molecular Diagnostics: ELITE InGenius® Instrument (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030).
- Extraction cartridges «ELITE InGenius® SP 200» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- Consumables for extraction and amplification «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS),
- Amplification cartridges «ELITE InGenius® PCR Cassette» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR),
- Tips «300 µL Filter Tips Axygen» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S),
- Boxes «ELITE InGenius® Waste Box» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000).
- Sarstedt 2.0 mL tube skirted screw-cap (Sarstedt Ref. 72.694.005).
- Sarstedt 0.5 mL tube skirted screw-cap (Sarstedt Ref. 72.730.005).
- 50 mL conical tube
- Specimen Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C.
- Microcentrifuge.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Laminar airflow hood.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C.
- Store the kit at 2-40°C until expiration date stated in the label, except the rehydrated Reaction-Mix tube. Once the *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept at 25°C±5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, we recommend storing at -20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).
- The rehydrated Reaction-Mix should be recapped and stored inside the pouch with desiccant material in order to protect from light and humidity.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend separating it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR, human genetics and *in vitro* diagnostic procedures (including training on ELITE InGenius®).

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®, ELITE InGenius® SP 200 extraction cartridge, any additional reagents required for testing, and ELITE InGenius® are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- Please make sure that ELITE InGenius® SP 200 extraction cartridge and ELITE InGenius® PCR Cassette are assembled correctly (see ELITE InGenius® Ref. INT030 Instructions for Use).
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not remove the cap of the ELITE InGenius® PCR Cassette after use. The cap of the ELITE InGenius® PCR Cassette are designed to prevent contamination.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the

environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.

- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.
- Consult the ELITE InGenius® User's Manual and 'ELITE InGenius® Quick Reference Guide' for additional warnings, precautions and procedures before using VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.
- Please make sure that the software of ELITE InGenius® System is the last updated version.

8. Test procedure

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® has been validated on faecal specimens. Another different types of samples must be validated by the user.

Collection, storage, and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, faecal specimens should be collected and labelled appropriately in clean containers. After collection, specimens should be placed in a biohazard bag and should be transported and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at Room Temperature (RT) for up to 2 hours, or at 2 to 8°C for up to 24 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guidelines (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. Sample Preparation and DNA extraction

Faecal samples should be collected in clean containers and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. We recommend using fresh samples.

For longer storage, the samples must be frozen between -20°C and -70 °C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise faecal sample as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles are not recommended.

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of the extraction kit used, ELITE InGenius® and 'ELITE InGenius® Quick Reference Guide'. Note that some other samples may require pre-processing. For faecal samples, use 'Stool sample: pre-treatment for bacterial and parasitic target with ELITE InGenius®' protocol. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

8.3. Extraction control

Reconstitute the extraction control (green vial) by adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly. Transfer the extraction control rehydrated to the 0.5 mL tube skirted screw-cap (Ref. 72.730.005).

8.4. Lyophilized Positive Control

Cryptosporidium, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control (red vial) by adding 950 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles

8.5. Lyophilized Reaction-Mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

8.6. PCR Condition

Note: Please, refer to the ELITE InGenius® User's Manual and 'ELITE InGenius® Quick Reference Guide' for detailed instructions.

8.6.1. PCR Test program for VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®

The product VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® can be used with the ELITE InGenius® system in order to perform:

- A. Integrated run (Extract + PCR)
- B. Amplification run (PCR only)
- C. Extraction run (Extraction only)

To setup an integrated run (A), carry out the following steps as per the Graphical user Interface (GUI).

- 1) Power on the instrument and login with your credentials.
- 2) Select 'Perform Run' from the 'Home' screen.

Note: Verify that the Amplification Controls (Positive Control and Negative Control) have been run and have not expired (status) along with the Amplification Reagent lot to be used. If you do not have valid and approved amplification controls, they should be run as outlined in the following sections.

- 3) Verify the 'Extraction Input Volume' is 200 µL and the 'Extracted Elute Volume' is 100 µL.
- 4) For each 'Track' scan or key the sample barcodes.
- 5) Select assay protocol in the 'Assay' column: VIASURE_KGE_00. Make sure the selected protocol is 'Extract + PCR'.
- 6) Select the sample loading position 'Sample position' column, and then select 'Extraction Tube'.
- 7) Load and verify all required consumables and reagents.
 - Load the Extraction Control and the *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix tube into the selected 'Inventory Block' following the instructions on the interface.
 - Load and check the Tip Racks in the 'Inventory Area' selected by following the GUI instruction.
 - Load the 'PCR Cassettes', the 'ELITE InGenius® SP 200' extraction cartridges, all the required consumables and the samples to be extracted, following the GUI instruction
- 8) Close door and start run.
- 9) View and approve results.

All the parameters needed for the session are included in the Assay protocol available on the instrument and are automatically recalled when the Assay protocol is selected.

A summary of program settings is shown below:

- I. Assay protocol name: VIASURE_KGE_00

II. Extraction

- a. Extraction Cassette Name: ELITE InGenius® SP 200.
- b. Extraction Input Volume: 200 µL
- c. Extraction Elution Volume: 100 µL

III. PCR

- a. Total Reaction Volume: 20 µL
- b. PCR Template Volume: 5 µL
- c. PCR protocol conditions:

Cycles	Step	Time (s)	Temperature
1	Initial denaturation	120	95°C
45	Denaturation	10	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50	60°C

Table 3. PCR Protocol.

- d. Read Fluorescence on the 'Annealing/Extension (Data collection*)' step. Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, *E. histolytica* and Extraction Control channels.

PCR only mode (B) implies all the steps mentioned above considering the following variations:

- Step 3: Even if no extraction will be carried out, ensure that the 'Extraction Input Volume' is 200 µL and the 'Extraction Elute Volume' is 100 µL.
- Step 6: Select 'PCR only' and set sample position as 'Elution tube' (bottom row).

Extraction only mode (C) implies all the steps mentioned above considering the following variations:

- Step 3: Ensure that the 'Extraction Input Volume' is 200 µL and the 'Extraction Elute Volume' is 100 µL.
- Step 6: Select 'Extraction only' and either 'Primary or Extraction tube'.

8.6.2. ELITE InGenius® Instrument set up

For instruction on how to configure the ELITE InGenius® System, including Setting up the instrument, Running an assay, Loading the cartridge rack and sample rack on ELITE InGenius®, review and approval of results, results output, finishing the run and maintenance, and Shutting down the instrument, refer to the ELITE InGenius® User's Manual and 'ELITE InGenius® Quick Reference Guide'.

9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyse and approve the data, refer to the ELITE InGenius® User's Manual.

All the result of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Extraction Control (EC) signal to verify the extraction procedure and/or correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions. Using the following tables 4 and 5 read and analyse the results.

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control tube and the presence of signal for *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and *E. histolytica* in the positive control tube. For a valid diagnostic test run, the following control conditions should be met:

Controls	<i>Cryptosporidium</i> ¹	<i>Giardia lamblia</i> ¹	<i>E. histolytica</i> ¹	Extraction Control	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	Positive	Positive	Positive	Positive ²	Passed
Negative Control (NC)	Negative or no signal	Negative or no signal	Negative or no signal	n.a.	Passed

Table 4. Expected Performance of Controls. no signal = no amplification curve

1 In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control tube for any target channel), all results are reported as 'failed' and retesting is required.

2 The Extraction Control (EC) should show an amplification signal (Positive value in positive control wells (PC)). Differences can be observed in the values of Ct in the extraction controls between the positive control and the clinical samples, due to the extraction process.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been validated and approved. It should be verified that amplification Positive Control and Negative Control were run with the lot of amplification reagent to be used. Both controls results will expire after 15 days.

If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, use the following criteria for read and analyse the results:

<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	Extraction Control	Interpretation for individual patients' samples	
Positive	Positive	Positive	Positive or no signal ¹	Passed	<i>Cryptosporidium, Giardia lamblia and E. histolytica</i> Positive
Negative	Negative	Negative	Positive	Passed	<i>Cryptosporidium, Giardia lamblia and E. histolytica</i> Negative
Positive	Negative	Negative	Positive or no signal ¹	Passed	<i>Cryptosporidium</i> Positive, <i>Giardia lamblia</i> and <i>E. histolytica</i> Negative
Positive	Positive	Negative	Positive or no signal ¹	Passed	<i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia lamblia</i> Positive, and <i>E. histolytica</i> Negative
Positive	Negative	Positive	Positive or no signal ¹	Passed	<i>Cryptosporidium</i> and <i>E. histolytica</i> Positive, and <i>Giardia lamblia</i> Negative
Negative	Positive	Negative	Positive or no signal ¹	Passed	<i>Giardia lamblia</i> Positive, <i>Cryptosporidium</i> and <i>E. histolytica</i> Negative
Negative	Positive	Positive	Positive or no signal ¹	Passed	<i>Giardia lamblia</i> and <i>E. histolytica</i> Positive, <i>Cryptosporidium</i> Negative
Negative	Negative	Positive	Positive or no signal ¹	Passed	<i>E. histolytica</i> Positive, <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia lamblia</i> Negative
Negative no signal	Negative or no signal	Negative or no signal	Negative or no signal ²	Failed	Test Failure – Repeat Testing ² Reported as 'Invalid' in the graphical user interface (GUI) in the ELITE InGenius® System.

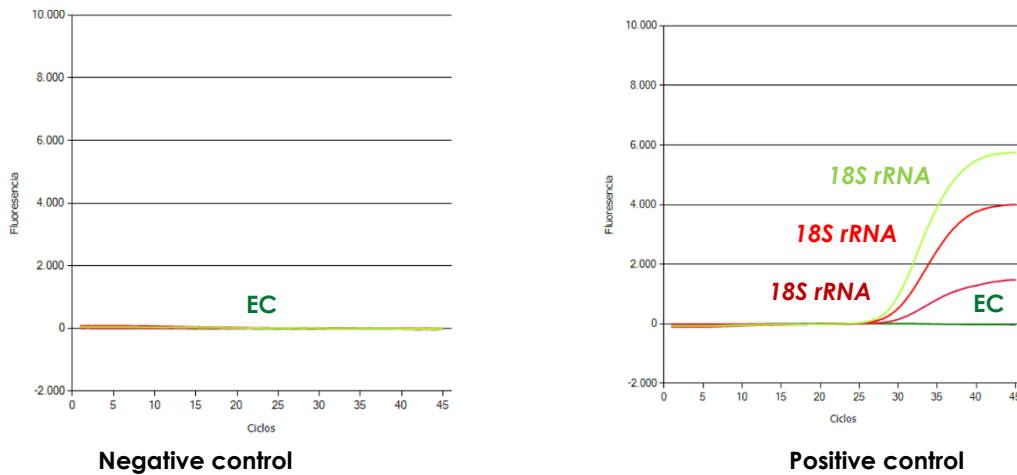
Table 5. Interpretation of patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve.

1 The Extraction Control (EC) shows or not an amplification signal (Positive or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids. Differences can be observed in the values of Ct in the extraction controls between the controls and the clinical samples, due to the extraction process.

2 In the case of *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and *E. histolytica* target genes negative, EC must show an amplification signal with. If there is an absence of signal or Ct value Negative of the Extraction Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the ELITE InGenius® User's Manual and 'ELITE InGenius® Quick Reference Guide' to verify the correct performance of extraction process, each RT-qPCR step and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the ELITE InGenius®.



10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with DNA extracted from human faecal samples.
- The performance evaluation characteristics have been evaluated following the PCR protocol named: VIASURE_KGE_00. In the case of using a protocol other than the one mentioned, the test must be validated by the end user.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample: nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica*, either the high number of DNA template copies which contains each *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* & *Entamoeba histolytica* Positive Control vial, samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* & *Entamoeba histolytica* Positive Control, which contains high copies of template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in an established order and in a separate laboratory area.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimen collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - A bacterial load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impact of antibiotics used to prevent *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.

If in doubt, refer to section 9 to check the correct interpretation of the results.

- A negative EC signal does not preclude the presence of *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* DNA in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable pathogens and does not imply that these pathogens are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of target bacterial sequences (*18S rRNA gene*).
- Negative results do not preclude *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak pathogen levels during infections caused by *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the pathogens.
- If diagnostic tests for other gastrointestinal diseases are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.

11. Quality control

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the Extraction Control (EC) in each specimen tube confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® was tested using clinical stool samples from patients with suspected gastrointestinal infection.

In order to determine the clinical diagnostic accuracy, different evaluations have been conducted through collaboration with national entities. A summary of the sites, sample type and workflow are included in the following table. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain)	Stool swabs	ELITE InGenius® SP 200 + ELITE InGenius® System	<i>Cryptosporidium</i>
				<i>Giardia</i>
				<i>E. histolytica</i>

Table 6. Site, sample type, workflow, and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	Overall agreement	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	Ziehl-Neelsen stain and microscopy visualization + RIDA®GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm)	<i>Cryptosporidium</i>	0.99 (0.95-0.99)	29	99	1*	0	1 (0.88-1)	0.99 (0.94-1)	0.96 (0.8-0.99)	1 (0.95-1)
		<i>Giardia</i>	1 (0.97-1)	32	97	0	0	1 (0.89-1)	1 (0.96-1)	1 (0.86-1)	1 (0.95-1)
		<i>E. histolytica</i>	1 (0.97-1)	20	109	0	0	1 (0.83-1)	1 (0.96-1)	1 (0.79-1)	1 (0.95-1)
		<i>Cryptosporidium</i> with $CT_{cut-off}$	1 (0.97-1)	29	100	0	0	1 (0.88-1)	1 (0.96-1)	1 (0.85-1)	1 (0.95-1)

Table 7. True positive (TP) and negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV), Predictive Negative Values (NPV) for VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.

* Discrepant samples were tested using the reference molecular method RIDA®GENE Bacterial Stool panel (r-Bpahrm). Results indicates that there were 1 false positive for *Cryptosporidium*. Using a cut-off 37.5 or 37 (only in Cy5 channel), all false positive values disappear.

Results show high agreement to detect *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and *E. histolytica* using VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® in stool samples.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® has a detection limit of 40 copies per reaction for *Cryptosporidium*, 25 copies per reaction for *Giardia lamblia* and 0.6 cells per reaction for *E. histolytica*.

12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and *E. histolytica* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common enteric pathogens or flora present in the intestine. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing					
<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Campylobacter lari</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila subsp. Hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 y O:9	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i>	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	Adenovirus 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella enterica subsp. Entérica</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus Genotypes I y II	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	-	Astrovirus Genotype 1-8	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	-	Ecovirus 30	-
Enterovirus 68 and 71	-	<i>Aeromonas caviae</i>	-	Sapovirus	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	Coxsackievirus A24, A9 y B3	-		

Table 8. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® for *Giardia lamblia* was evaluated against DNA extracted from *Giardia intestinalis* culture (synonym: *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*), showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® for *Entamoeba histolytica* was evaluated against DNA extracted from *Entamoeba histolytica*, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® for *Cryptosporidium* was evaluated against DNA extracted from *Cryptosporidium parvum*, showing positive results.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® es una prueba de diagnóstico in vitro automatizada, diseñada para la detección cualitativa de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica* en muestras fecales humanas de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto de la prueba es facilitar el diagnóstico de la infección producida por *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica* en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El ensayo está validado con ELITE InGenius®, un sistema automatizado e integrado para la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos. El DNA se extrae de muestras fecales, se multiplica mediante amplificación en tiempo real y se detecta utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente para detectar *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica*.

2. Introducción y explicación

Los protozoos entéricos siguen causando las enfermedades parasitarias más comunes que afectan a millones de personas cada año y suponen una morbilidad y mortalidad significativamente alta en todo el mundo. Entre ellos, *Cryptosporidium spp*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* son los principales agentes etiológicos.

Cryptosporidium puede transmitirse por varias vías: contacto persona a persona y con animales de compañía y/o de granja, así como ingestión de alimentos, agua potable y aguas para uso recreativo contaminadas. *Cryptosporidium* puede estar presente de forma asintomática o causar diarrea y malestar abdominal con pérdida de peso y mala absorción. La infección por *Giardia lamblia* tiene lugar por transmisión fecal-oral, a través del contacto directo o por ingestión de agua o comida contaminada. La diarrea es el principal síntoma de esta enfermedad, pero las manifestaciones clínicas varían, desde infecciones asintomáticas a diarreas agudas, calambres abdominales, hinchazón y flatulencia a menudo acompañadas de náuseas y pérdida de peso. La enfermedad transmitida por *Entamoeba histolytica* se propaga principalmente por agua o comida contaminada con quistes, pero también puede transmitirse de persona a persona por vía feco-oral. Las características clínicas de la amebiasis van desde una colonización asintomática (90% de los casos) hasta una disentería amebiana (dolor estomacal, náuseas o vómitos y diarrea severa hemorrágica y fiebre) o enfermedad invasiva extraintestinal, más comúnmente en forma de abscesos hepáticos.

Se ha considerado que la microscopía es el método estándar de referencia para el diagnóstico de estos parásitos. Sin embargo, requiere mucho tiempo, no es muy sensible y es incapaz de distinguir la *E. histolytica* patógena invasiva del parásito comensal *E. dispar*. El ensayo de PCR en tiempo real requiere menos mano de obra y tiene una mayor sensibilidad y especificidad, lo que lo convierte en una alternativa atractiva.

3. Procedimiento

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® está diseñado para la detección cualitativa de DNA de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica* en muestras fecales. Después del aislamiento del DNA, la identificación de estos patógenos se realiza mediante la

amplificación de una región conservada del gen 18S rRNA para *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia.

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en el sistema ELITE InGenius®.

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPS, tampón y polimerasa) en formato estabilizado, así como un control de extracción para monitorear la inhibición de la PCR. La diana de DNA de *Cryptosporidium* se amplifican y detectan in el canal Cy5, la diana de DNA de *Giardia lamblia* se amplifica y detecta en el canal FAM, la diana de DNA de *Entamoeba histolytica* se amplifica y detecta en el canal ROX y el control de extracción (EC), en el canal HEX, VIC o JOE.

Diana	ELITE InGenius® Canal	Fluoróforo Compatible	Gen
<i>Cryptosporidium</i>	Ch 5	Cy5	18S rRNA
<i>Giardia lamblia</i>	Ch 1	FAM	18S rRNA
<i>Entamoeba histolytica</i>	Ch 4	ROX	18S rRNA
Control de extracción (CE)	Ch 2	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla 1. Dianas, canales y genes.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 2:

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampon, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.	Blanco	4 viales
Rehydration buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado.	Azul	1 vial x 1.8mL
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	2 viales x 1 mL

Tabla 2. Reactivos y materiales suministrados en el kit VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® con N° de catálogo: VS-2340KGE196TE.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.

- Instrumento Extracción automática y Amplificación para diagnóstico molecular: ELITE InGenius® Instrument (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030).
- Cartuchos de extracción «ELITE InGenius® SP 200» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200).
- Consumables para extracción y amplificación «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS).
- Cartuchos de amplificación «ELITE InGenius® PCR Cassette» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR).
- Puntas «300 µL Filter Tips Axygen» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).
- Cajas «ELITE InGenius® Waste Box» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000).
- Tapón de rosca con faldón para tubo Sarstedt de 2,0 mL (Ref. Sarstedt 72.694.005).
- Tapón de rosca con faldón para tubo Sarstedt de 0,5 mL (Ref. Sarstedt 72.730.005).
- Tubo cónico de 50mL.
- Sistema de recogida y transporte de muestras.
- Congeladores de laboratorio: -30°C a -10°C y/o ≤-70°C.
- Microcentrífuga.
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20µL, 20-200µL).
- Puntas de filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Campana de flujo de aire laminar.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- Los kits se pueden enviar y almacenar a 2-40°C.
- Almacenar el kit a 2-40°C hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta, excepto el tubo de la mezcla de reacción rehidratado. Una vez reconstituido el tubo de mezcla de reacción de *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica*, puede conservarse a 25°C ± 5°C o 2°C a 8°C durante un máximo de 4 horas. Durante un período de tiempo más largo, recomendamos almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta 6 veces).
- La mezcla de reacción rehidratada debe volver a taparse y almacenarse dentro de la bolsa con material desecante para protegerla de la luz y la humedad.
- Una vez resuspendido el control positivo, almacenar a -20°C. Recomendamos separarlo en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado que el control positivo sigue siendo estable después de 6 ciclos de congelación-descongelación.
- Mantener los componentes alejados de la luz solar.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para ser utilizado por personal de laboratorio clínico calificado y capacitado específicamente instruido y capacitado en las técnicas de PCR en tiempo real, genética humana y procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluyendo formación en el sistema ELITE InGenius®).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de cierre de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso. Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®, cartucho de extracción ELITE InGenius® SP 200, cualquier otro reactivo necesario para la prueba y ELITE InGenius® no están contaminados. Evitar siempre la contaminación microbiana y ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos y los cartuchos.
- Asegúrese de que el cartucho de extracción ELITE InGenius® SP 200 y ELITE InGenius® PCR Cassette están ensamblados correctamente (consulte las instrucciones de uso de ELITE InGenius® Ref. INT030).
- Para evitar la contaminación del medio ambiente por amplicones, no retire la tapa de ELITE InGenius® PCR Cassette después de su uso. La tapa de ELITE InGenius® PCR Cassette está diseñada para evitar la contaminación.

- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- Consultar el manual de usuario ELITE InGenius® y las instrucciones rápidas "ELITE InGenius® Quick Reference Guide" para advertencias, precauciones y procedimientos adicionales antes de utilizar VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.
- Asegúrese de que el software del sistema ELITE InGenius® sea la última versión disponible actualizada.

8. Procedimiento del test

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® ha sido validado en muestras fecales. Otros tipos de muestras deben ser validadas por el usuario.

La recolección, el almacenamiento y el transporte de las muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras fecales deben recolectarse y etiquetarse adecuadamente en recipientes limpios. Después de la recolección, las muestras deben colocarse en una bolsa de riesgo biológico y deben transportarse y procesarse lo antes posible para garantizar la calidad de la prueba. Las muestras deben transportarse a temperatura ambiente (TA) durante un máximo de 2 horas, o entre 2 y 8°C durante un máximo de 24 horas, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patógeno. Para el transporte a largo plazo (más de 24 horas), recomendamos el envío a -20°C o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para la prueba. Las muestras se pueden almacenar entre 2 y 8°C durante un máximo de 24 horas o se pueden congelar a -20°C o idealmente a -70°C para su conservación. Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación-descongelación para evitar la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas siguiendo las pautas de laboratorio adecuadas. Para más detalles, consultar las pautas de los CDC (pautas de recolección de muestras. Sitio web

<https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

8.2. Preparación de la muestra y extracción de DNA

Las muestras fecales deben recogerse en recipientes limpios y procesarse lo antes posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas.

Para un almacenamiento más prolongado, las muestras deben congelarse entre -20°C y -70 °C. En este caso, la muestra se descongelará por completo y se llevará a temperatura ambiente antes de realizar la prueba. Se debe homogeneizar la muestra fecal lo más minuciosamente posible antes de su preparación. No se recomiendan los ciclos de congelación y descongelación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones de las instrucciones de uso del kit utilizado, ELITe InGenius® y la guía rápida "ELITe InGenius® Quick Reference Guide". Tener en cuenta que otros tipos de muestras pueden requerir un preprocesamiento previo. Para las muestras fecales, utilizar "Muestras de heces: pretratamiento para dianas bacterianas y parásitos con el protocolo ELITe InGenius®". El usuario debe desarrollar y validar procedimientos de preparación de extracción específicos de la aplicación.

8.3. Control de Extracción

Reconstituir el control de extracción (vial verde) agregando 500µL de agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) y agitar bien. Transferir el control de extracción rehidratado al tubo de tapón de rosca con faldón de 0.5 mL (Ref. 72.730.005).

8.4. Control Positivo Liofilizado

Cryptosporidium, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control contiene un elevado número de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 950µL de Agua libre de RNasa/DNasa suministrada (vial blanco) y agitar bien en el vórtex.

Una vez resuspendido el control positivo, conservar a -20°C. Se recomienda separarlo en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.5. Tubo de mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo el *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

8.6. Condición de PCR

Nota: Consulte el manual del usuario de ELITE InGenius® y la guía rápida "ELITE InGenius® Quick Reference Guide" para obtener instrucciones detalladas.

8.6.1. Programa de prueba de PCR para VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®

El producto VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® se puede utilizar con el sistema ELITE InGenius® para realizar:

- A. Ejecución integrada (Extracción + PCR)
- B. Amplificación (Solo PCR)
- C. Extracción (Solo extracción)

Para configurar una ejecución integrada (A), se deben llevar a cabo los siguientes pasos según la interfaz gráfica de usuario (GUI).

- 1) Encender el instrumento e iniciar sesión con las credenciales.
- 2) Seleccionar "Perform run" en la pantalla "Home".

Nota: Verificar que los controles de amplificación (control positivo y control negativo) se hayan ejecutado y no hayan caducado (estatus) junto con el lote de reactivo de amplificación que se utilizará. Si no se dispone de controles de amplificación válidos y aprobados, se deben ejecutar como se describe en las siguientes secciones.

- 3) Verifique que el "Volumen de entrada de extracción" sea 200µL y el "Volumen de elución extraído" sea 100µL.
- 4) Para cada "Track", escanear o ingresar los códigos de barras de la muestra.
- 5) Seleccionar el protocolo del ensayo en la columna "Assay": VIASURE_KGE_00. Se debe asegurar de que el protocolo seleccionado sea "Extract + PCR".
- 6) Seleccionar la posición de carga de la muestra "Sample position", y después seleccionar "Extraction tube".
- 7) Cargar y verificar todos los consumibles y reactivos necesarios.

- Cargar el control de extracción y el tubo de mezcla de reactivos de *Cryptosporidium*, *Giardia* y *E. histolytica* en el "Inventory Block" seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz.
 - Cargar y comprobar los bastidores de puntas en el "Inventory Area" seleccionado siguiendo las instrucciones de la GUI.
 - Cargar los "PCR Cassettes", los cartuchos de extracción "ELITE InGenius® SP 200", todos los consumibles necesarios y las muestras a extraer, siguiendo las instrucciones de la GUI.
- 8) Cerrar la puerta y comenzar la ejecución.
- 9) Ver y aprobar los resultados.

Todos los parámetros necesarios para la sesión se incluyen en el protocolo de ensayo disponible en el instrumento y se recuperan automáticamente cuando se selecciona el protocolo de ensayo.

A continuación se muestra un resumen de la configuración del programa:

- I. Nombre del protocolo del ensayo: VIASURE_KGE_00
- II. Extracción
 - a. Nombre del Casete de extracción: ELITE InGenius® SP 200
 - b. Volumen de entrada de extracción: 200µL
 - c. Volumen de elución de extracción: 100µL.
- III. PCR
 - a. Volumen total de la reacción: 20µL
 - b. Volumen del molde de ácido nucleico de la PCR: 5µL
 - c. Condiciones de protocolo de la PCR

Ciclos	Paso	Tiempo (s)	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	120	95°C
45	Desnaturalización	10	95°C
	Hibridación/Elongación (Recopilación de datos*)	50	60°C

Tabla 3. Protocolo de la PCR.

- d. Leer la fluorescencia en el paso "Hibridación/Elongación (Recopilación de datos*)". Los datos fluorogénicos deben recopilarse durante el paso de extensión (*) a través de los canales de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, *E. histolytica* y Control de Extracción.

El modo "PCR only" (B) implica todos los pasos mencionados anteriormente considerando las siguientes variaciones:

- Paso 3: Incluso si no se va a realizar ninguna extracción, asegúrese de que el "Volumen de entrada de extracción" sea 200µL y el "Volumen de elución de extracción" sea 100µL.
- Paso 6: seleccionar "PCR only" y configurar la posición de la muestra como "Elution tube (fila inferior)".

El modo "Extraction only" (C) implica todos los pasos mencionados anteriormente considerando las siguientes variaciones:

- Paso 3: Asegúrese de que el 'Volumen de entrada de extracción' sea 200µL y el 'Volumen de elución de extracción' sea 100µL.
- Paso 6: seleccionar "Extraction only" y "Primary o Extraction tube".

8.6.2. Configuración del instrumento ELITE InGenius®

Para obtener instrucciones sobre cómo configurar el sistema ELITE InGenius®, incluida la configuración del instrumento, la ejecución del ensayo, la carga de la gradilla de cartuchos y la gradilla de la muestra en ELITE InGenius®, la revisión y aprobación de los resultados, la salida de los resultados, la finalización de la ejecución y el mantenimiento, y para apagar el instrumento, se debe consultar el manual del usuario de ELITE InGenius® y la guía rápida "ELITE InGenius® Quick Reference Guide".

9. Interpretación de resultados

Para una descripción detallada de cómo analizar y aprobar los datos, consulte el manual de usuario de ELITE InGenius®.

El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud. Comprobar la emisión de la señal del Control de Extracción (CE) para verificar el proceso de extracción y/o el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Leer y analizar los resultados con ayuda de las tablas 4 y 5.

El uso de los controles positivo y negativo en cada ensayo, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal en el pocillo del control positivo de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *E. histolytica*. Para una ejecución válida de la prueba de diagnóstico, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	<i>Cryptosporidium</i> ¹	<i>Giardia lamblia</i> ¹	<i>E. histolytica</i> ¹	Control de Extracción	Interpretación de controles
Control Positivo (CP)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo ²	Válido
Control Negativo (CN)	Negativo o sin señal	Negativo o sin señal	Negativo o sin señal	n.a.	Válido

Tabla 4. Rendimiento esperado de los controles. Sin señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "fallidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de Extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación (Valor Positivo en los pocillos del control positivo (CP)). Se pueden observar diferencias en los valores de Ct obtenidos en el canal del control de extracción entre el control positivo y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Se debe verificar que

el control positivo y el control negativo de amplificación se hayan procesado con el lote de reactivo de amplificación que se va a utilizar. Los resultados de ambos controles caducarán a los 15 días.

Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	Control de Extracción	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo o sin señal ¹	Válido	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Válido	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> Negativo
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo o sin señal ¹	Válido	<i>Cryptosporidium</i> Positivo, <i>Giardia lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> Negativo
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo o sin señal ¹	Válido	<i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia lamblia</i> Positivo, y <i>E. histolytica</i> Negativo
Positivo	Negativo	Positivo	Positivo o sin señal ¹	Válido	<i>Cryptosporidium</i> y <i>E. histolytica</i> Positivo, y <i>Giardia lamblia</i> Negativo
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo o sin señal ¹	Válido	<i>Giardia lamblia</i> Positivo, <i>Cryptosporidium</i> y <i>E. histolytica</i> Negativo
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo o sin señal ¹	Válido	<i>Giardia lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> Positivo, <i>Cryptosporidium</i> Negativo
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo o sin señal ¹	Válido	<i>E. histolytica</i> Positivo, <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia lamblia</i> Negativo
Negativo o sin señal	Negativo o sin señal	Negativo o sin señal	Negativo o sin señal ²	No válido	Fallo en el test – Repetir test ² Reportado como "no válido" en la interfaz gráfica de usuario (GUI) del sistema ELITE InGenius®.

5. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores. sin señal = sin curva de amplificación.

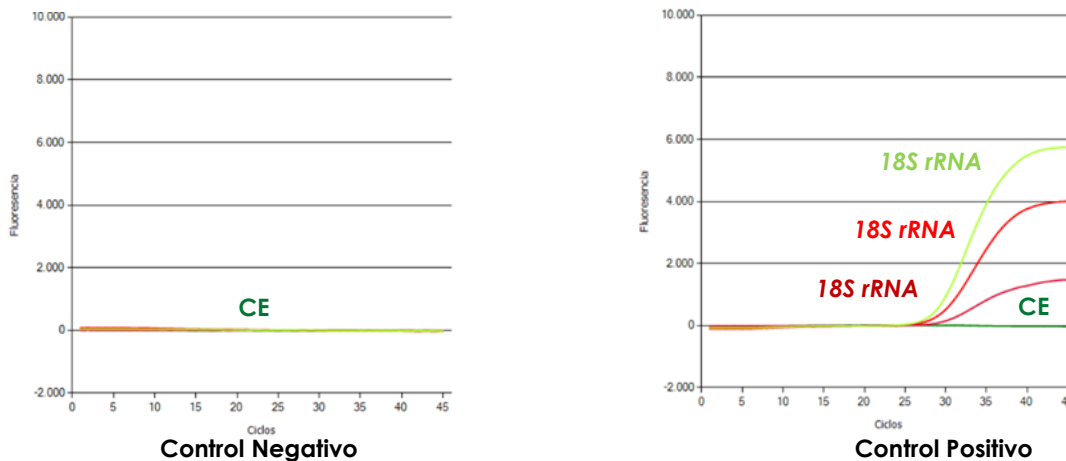
¹ El Control de Extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación (Positivo o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. Se pueden observar diferencias en los valores de Ct obtenidos en el canal del control de extracción respecto a los obtenidos con el control negativo y positivo y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

² En el caso de que los genes diana de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *E. histolytica* resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct Negativo del control de extracción, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:

100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones del manual de usuario de ELITE InGenius® y la guía rápida "ELITE InGenius® Quick Reference Guide" para verificar el correcto rendimiento del proceso de extracción, verificar cada etapa de la RT-qPCR y revisar los parámetros, y para verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

Figura 1. Correcta amplificación del control negativo y positivo en el equipo ELITE InGenius®.



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras fecales humanas.
- La evaluación se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo de PCR denominado: VIASURE_KGE_00. En caso de utilizar un protocolo distinto al mencionado, la evaluación deberá ser responsabilidad del usuario final.
- Para tener un buen rendimiento de la prueba, el producto liofilizado debe encontrarse en la parte inferior del tubo y no adherido a la parte superior del tubo o al sello de aluminio. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- La calidad de la prueba depende de la calidad de la muestra; Se debe extraer el ácido nucleico extraído correctamente de las muestras fecales.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias 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 *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica*, ya sea por el gran número de copias de molde DNA que contiene cada vial *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* Positive Control, muestras que contienen altas

concentraciones de DNA molde diana, o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNasa/DNasa (vial blanco). Cada uno de los procesos deben llevarse a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Una carga bacteriana en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de RT-qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de antibióticos utilizados para prevenir *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica* o durante el tratamiento de la infección.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.

En caso de duda, consulte la sección 9 para comprobar la interpretación correcta de los resultados.

- Una señal de CE negativa no excluye la presencia de DNA de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* en una muestra clínica.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de patógenos viables y no implica que estos patógenos sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana (gen *18S rRNA*).
- Resultados negativos o la amplificación de una única diana no excluyen padecer la infección por *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica* y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga viral durante las infecciones causadas por *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica*. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar los patógenos.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades gastrointestinales son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica*, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.

11. Control de calidad

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

El rendimiento clínico de VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® se probó utilizando muestras fecales de pacientes con sospecha de infección gastrointestinal.

Para determinar la precisión del diagnóstico clínico, se han llevado a cabo diferentes evaluaciones en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de los lugares, el tipo de muestra y el flujo de trabajo:

	Lugar	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain)	Hisopos fecales	ELITE InGenius® SP 200 + ELITE InGenius® System	<i>Cryptosporidium</i>
				<i>Giardia</i>
				<i>E. histolytica</i>

Tabla 6. Lugar, tipo de muestra, flujo de trabajo y diana.

Los valores positivos y negativos verdaderos, los falsos negativos y falsos positivos, la sensibilidad, la especificidad, los valores de PPV y NPV para VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® se calcularon en relación con cada ensayo comparador, como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Test comparador	Diana	Concordancia global	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	Ziehl-Neelsen stain and microscopy visualization + RIDA®GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm)	<i>Cryptosporidium</i>	0.99 (0.95-0.99)	29	99	1*	0	1 (0.88-1)	0.99 (0.94-1)	0.96 (0.8-0.99)	1 (0.95-1)
		<i>Giardia</i>	1 (0.97-1)	32	97	0	0	1 (0.89-1)	1 (0.96-1)	1 (0.86-1)	1 (0.95-1)
		<i>E. histolytica</i>	1 (0.97-1)	20	109	0	0	1 (0.83-1)	1 (0.96-1)	1 (0.79-1)	1 (0.95-1)
		<i>Cryptosporidium</i> with CT _{cut-off}	1 (0.97-1)	29	100	0	0	1 (0.88-1)	1 (0.96-1)	1 (0.85-1)	1 (0.95-1)

Tabla 7. Concordancia global, Valores positivo y negativos verdaderos, valores positivo y negativo falsos, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.

* Las muestras discrepantes se analizaron utilizando el método molecular de referencia RIDA®GENE Bacterial Stool panel (r-Bpharm). Los resultados indican que hubo 1 falso positivo para *Cryptosporidium*. Utilizando un límite de 37,5 o 37 (solo en el canal Cy5), todos los valores falsos positivos desaparecen.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar *Cryptosporidium*, *Giardia* y *E. histolytica* utilizando VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® en muestras fecales.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® Kit tiene un límite de detección de 40 copias por reacción para *Cryptosporidium*, 25 copias por reacción para *Giardia* y 0.6 células por reacción para *E. histolytica*.

12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *E. histolytica* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal. No se detectan reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados:

Prueba de reactividad cruzada					
<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Campylobacter lari</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila subsp. Hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 y O:9	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i>	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	Adenovirus 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella enterica subsp. Entérica</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus Genotypes I y II	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	-	Astrovirus Genotype 1-8	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	-	Ecovirus 30	-
Enterovirus 68 and 71	-	<i>Aeromonas caviae</i>	-	Sapovirus	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	Coxsackievirus A24, A9 y B3	-		

Tabla 8. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.











12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® para *Giardia lamblia* se evaluó frente a DNA extraído de cultivo de *Giardia intestinalis* (sinónimo: *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*), mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® para *Entamoeba histolytica* se evaluó frente a DNA extraído de *Entamoeba histolytica*, mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® para *Cryptosporidium* se evaluó frente a DNA extraído de *Cryptosporidium parvum*, mostrando resultados positivos.

Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 <i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 Unique Device Identification Identificación única de dispositivo	 Catalogue number Número de referencia

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

ELITE InGenius® technology is covered by patents and requests for patents.

Change Control / Control de Cambios		
Version No. / Versión nº	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original version/ Versión original	13/01/2022

Table A 2. Control change table / Tabla de Control de Cambios.

Revision: 13 enero 2022

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01

