

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



*Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica*  
for ELITe InGenius®

CE IVD



Diese Gebrauchsanleitung bezieht sich auf folgende Referenzen / Estas instrucciones de uso aplican para la siguiente referencia:

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

Tabelle A 1. Referenzen für das Produkt, zu verwenden mit dem ELITE InGenius®. / Referencia del producto para ser usado con ELITE InGenius®.

## Inhalt

1.	Verwendungszweck.....	5
2.	Zusammenfassung und Erläuterung .....	5
3.	Verfahrensprinzip.....	5
4.	Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien.....	6
5.	Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung .....	6
6.	Transport- und Lagerbedingungen .....	7
7.	Sicherheitshinweise für Benutzer .....	7
8.	Testverfahren .....	9
8.1.	Probenentnahme, -transport und -lagerung.....	9
8.2.	Probenvorbereitung und DNA-Extraktion .....	9
8.3.	Extraktionskontrolle.....	10
8.4.	Lyophilisierte Positivkontrolle.....	10
8.5.	Röhrchen mit lyophilisiertem Reaction Mix.....	10
8.6.	PCR-Bedingungen.....	11
8.6.1.	PCR-Testprotokoll für das VIASURE <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.....	11
8.6.2.	Einrichtung des ELITE InGenius® Instruments.....	13
9.	Ergebnisinterpretation.....	13
10.	Grenzen des Tests.....	15
11.	Qualitätskontrolle .....	16
12.	Testeigenschaften.....	17
12.1.	Klinische Empfindlichkeit und Spezifität .....	17
12.2.	Analytische Empfindlichkeit .....	17
12.3.	Analytische Spezifität .....	18
12.4.	Analytische Reaktivität .....	19

## Contenido

1.	Usó previsto.....	20
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 .....	32
12.	Características del test .....	32
12.1.	Sensibilidad y especificidad clínica .....	32
12.2.	Sensibilidad analítica .....	33
12.3.	Especificidad analítica .....	33
12.4.	Reactividad analítica .....	34
	Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i> .....	35
	Marken .....	35

---

## DEUTSCH

---

### 1. Verwendungszweck

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® ist ein automatisierter in-vitro-diagnostischer Test zum qualitativen Nachweis von *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und/oder *Entamoeba histolytica* in humanen Stuhlproben von Patienten mit Symptomen einer gastrointestinalen Infektion. Dieser Assay soll in Kombination mit klinischen und epidemiologischen Risikofaktoren als Hilfsmittel bei der Diagnose von Infektionen mit *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und/oder *Entamoeba histolytica* dienen. Der Assay wurde validiert auf dem ELITE InGenius®, einem automatisierten und integrierten System zur Extraktion, Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren. Hierzu wird DNA aus Stuhlproben extrahiert, durch Echtzeit-Amplifikation vervielfältigt und mithilfe spezifischer Primer und einer Sonde mit fluoreszierendem Reporterfarbstoff nachgewiesen, die für *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und/oder *Entamoeba histolytica* spezifisch sind.

### 2. Zusammenfassung und Erläuterung

Enterische Protozoen sind nach wie vor die am häufigsten auftretenden Erreger parasitärer Erkrankungen, die jedes Jahr Millionen von Menschen betreffen und weltweit zu hoher Morbidität und Mortalität führen. Darunter sind *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* und *Giardia lamblia* die wichtigsten ätiologischen Faktoren.

*Cryptosporidium* kann von Mensch zu Mensch, durch Kontakt mit Haus- und Nutztieren, durch die Aufnahme von Lebensmitteln und Trinkwasser sowie über Freizeitgewässer, die mit dem Erreger kontaminiert sind, übertragen werden. *Cryptosporidium* kann vorliegen, ohne Symptome auszulösen, oder Durchfall und Abdominalbeschwerden mit Gewichtsverlust und Malabsorption verursachen. Die Infektion mit *Giardia lamblia* erfolgt über den fäkal-oralen Übertragungsweg, entweder durch direkten Kontakt oder durch Aufnahme von Lebensmitteln oder Wasser, die mit dem Erreger kontaminiert sind. Durchfall ist das Hauptsymptom der Erkrankung, jedoch variieren die klinischen Erscheinungsformen von nicht symptomatischen Infektionen bis hin zu schwerem Durchfall, Bauchkrämpfen, Blähungen und Flatulenz, oft begleitet von Übelkeit und Gewichtsverlust. *Entamoeba histolytica* wird in erster Linie durch Lebensmittel oder Wasser verbreitet, die mit Zysten verunreinigt sind, kann aber auch über den fäkal-oralen von Mensch zu Mensch Weg übertragen werden. Die klinischen Merkmale der Amöbiasis reichen von einer asymptomatischen Besiedlung (90 % der Fälle) über Amöbenruhr (Bauchschmerzen, Übelkeit oder Erbrechen und schwere Diarrhö mit blutigem und schleimigem Stuhl, Fieber) bis hin zu invasiven extraintestinalen Erkrankungen, am häufigsten in Form von Leberabszessen.

Die Mikroskopie gilt als Goldstandardmethode für die Diagnose dieser Parasiten. Sie ist jedoch zeitaufwändig, nicht sehr empfindlich und kann nicht zwischen dem invasiven pathogenen Erreger *E. histolytica* von dem Kommensalparasiten *E. dispar* unterscheiden. Der Echtzeit-PCR-Test ist weniger arbeitsintensiv und bietet eine höhere Empfindlichkeit und Spezifität, was ihn zu einer attraktiven Alternative macht.

### 3. Verfahrensprinzip

VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® ist vorgesehen für den qualitativen Nachweis von DNA aus *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und/oder *Entamoeba histolytica* in Stuhlproben. Nach der DNA-Isolation erfolgt die Identifizierung dieser Pathogene durch Amplifikation einer konservierten Region des 18S-rRNA-Gens von *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica* mithilfe spezifischer Primer und einer fluoreszenzmarkierten Sonde.

Das VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird mit dem ELITE InGenius® gemessen.

Das VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® enthält in jedem Well bereits alle für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer und Polymerase) in stabilisierter Form sowie eine Extraktionskontrolle zur Prüfung auf eine PCR-Inhibition. *Cryptosporidium*-Ziel-DNA wird im Cy5-Kanal, *Giardia lamblia*-Ziel-DNA im FAM-Kanal, *Entamoeba histolytica*-Ziel-DNA im ROX-Kanal und die Extraktionskontrolle (EK) im HEX-, VIC- oder JOE-Kanal amplifiziert und nachgewiesen.

Zielsequenz	ELITE InGenius®-Kanal	Kompatible Fluorophore	Gen
<i>Cryptosporidium</i>	Kanal 5	Cy5	18S-rRNA
<i>Giardia lamblia</i>	Kanal 1	FAM	18S-rRNA
<i>Entamoeba histolytica</i>	Kanal 4	ROX	18S-rRNA
Extraction Control (EC)	Kanal 2	HEX, VIC oder JOE *	-

Tabelle 1. Zielsequenz, Kanal und Gene.

#### 4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Im VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® sind die in Tabelle 2 aufgeführten Materialien und Reagenzien enthalten:

Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe	Menge
<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Reaction-Mix tube	Eine Mischung aus Enzymen, Primern, Sonde, Puffer, dNTP und Stabilisatoren in stabilisierter Form	Weiß	4 Fläschchen
Rehydration Buffer	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	Blau	1 Fläschchen x 1,8 ml
Extraction Control	Nicht-infektiöse Nukleinsäure, lyophilisiert	Grün	1 Fläschchen
<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Positive Control	Nicht-infektiöse synthetische lyophilisierte DNA	Rot	1 Fläschchen
Negative Control	Kontrolle ohne Template	Violett	1 Fläschchen x 1 ml
Wasser, RNase/DNase-frei	RNase-/DNase-freies Wasser	Weiß	2 Fläschchen x 1 ml

Tabelle 2. Im Lieferumfang des VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® mit der Kat.-Nr. VS-2340KGE196TE enthaltene Reagenzien und Materialien

#### 5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

In der folgenden Liste sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® enthaltenen Materialien aufgeführt.

- Automatisierte Sample-to-Result-Lösung für die Molekulardiagnostik: ELITE InGenius® Instrument (ELITechGroup S.p.A., Ref.-Nr. INT030)

- Extraktionskartuschen „ELITE InGenius® SP 200“ (ELITechGroup S.p.A., Ref.-Nr. INT032SP200)
- Verbrauchsmaterialien für die Extraktion und Amplifikation „ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set“ (ELITechGroup S.p.A, Ref.-Nr. INT032CS)
- Amplifikationskartuschen „ELITE InGenius® PCR Cassette“ (ELITechGroup S.p.A., Ref.-Nr. INT035PCR)
- Pipettenspitzen „300 µl Filter Tips Axygen“ (Axygen BioScience Inc., CA, USA, Ref.-Nr. TF-350-L-R-S)
- Behälter „ELITE InGenius® Waste Box“ (ELITechGroup S.p.A, Ref.-Nr. F2102-000)
- Sarstedt 2,0-ml-Röhrchen mit Stehrand und Schraubkappe (Sarstedt Ref. 72.694.005)
- Sarstedt 0,5-ml-Röhrchen mit Stehrand und Schraubkappe (Sarstedt Ref.-Nr. 72.730.005)
- Konisches Röhrchen, 50 ml
- Probensammel- und Transportsystem
- Labor-Gefriergeräte: -30 °C bis -10 °C und/oder  $\leq -70$  °C
- Mikrozentrifuge
- Vortexmischer
- Mikropipetten (0,5–20 µl, 20–200 µl)
- Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe
- Abzugshaube mit laminarem Luftstrom

## 6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bei 2–40 °C transportiert und gelagert werden.
- Lagern Sie das Kit bei 2–40 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum, ausgenommen Röhrchen mit rehydriertem Reaction-Mix tube. Nach der Rekonstitution kann das *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix tube bei 25 °C  $\pm$  5 °C oder für bis zu 4 Stunden bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Für längere Zeiträume wird empfohlen, das Röhrchen bei -20 °C zu lagern und in Aliquote aufzuteilen, um die Einfrier- und Auftauzyklen auf ein Minimum zu beschränken (bis zu 6 Mal).
- Der rehydrierte Reaction-Mix tube sollte wieder verschlossen und im Beutel mit Trockenmittel gelagert werden, um ihn vor Licht und Feuchtigkeit zu schützen.
- Nachdem die Positivkontrolle resuspendiert wurde, sollte sie bei -20 °C gelagert werden. Wir empfehlen eine Aufteilung in Aliquote, um die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen auf ein Minimum zu beschränken. Es konnte validiert werden, dass die Positivkontrollen auch nach 6 Einfrier-/Auftauzyklen noch stabil sind.
- Die Komponenten vor Sonnenlicht schützen.

## 7. Sicherheitshinweise für Benutzer

- Das Produkt ist für die Verwendung durch qualifiziertes und geschultes klinisches Laborpersonal bestimmt, das speziell in den Techniken der Real-Time-PCR, der Humangenetik und *In-vitro*-Diagnoseverfahren (einschließlich der Schulung am ELITE InGenius®) unterwiesen und geschult wurde.
- *In-vitro*-Diagnostikum.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.



- Einmal geöffnet, Trockenmittel nicht aus dem Reagenzbeutel entfernen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen. Vor dem Verschließen Luftüberschuss aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Beuteln und/oder Kits und/oder Chargen und/oder anderer Anbieter nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.
- Zeigt das Reaktionsgemisch in stabilisierter Form, das sich in der Regel am Boden des Röhrchens befindet, ein anderes Erscheinungsbild als üblich (keine konische Form, Inhomogenität, kleineres/größeres Volumen und/oder eine andere Farbe als weißlich), hat dies keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Tests.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Bringen Sie Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien nicht in einen Bereich zurück, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde. Verwenden Sie zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse getrennte Bereiche für die Vorbereitung von Patientenproben und Kontrollen.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests im selben allgemeinen Bereich des Labors durchgeführt werden, muss sichergestellt werden, dass das VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®, die ELITE InGenius® SP 200 Extraktionskartusche, alle zusätzlichen für den Test erforderlichen Reagenzien und das ELITE InGenius®-Gerät nicht kontaminiert werden. Vermeiden Sie unter allen Umständen die Kontamination der Reagenzien durch Mikroorganismen sowie Ribonuklease (RNase) beziehungsweise Desoxyribonuklease (DNase). Die Verwendung von RNase-/DNase-freien aerosolresistenten Einweg-Pipettenspitzen oder Direktverdrängungspipettenspitzen wird empfohlen. Verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen Handschuhe wechseln.
- Sicherstellen, dass die ELITE InGenius® SP 200 Extraktionskartusche und die ELITE InGenius® PCR Cassette korrekt zusammengesetzt werden (siehe ELITE InGenius® Ref.-Nr. INT030 Gebrauchsanleitung).
- Um die Kontamination der Umgebung durch Amplikons zu vermeiden, die Kappe der ELITE InGenius® PCR Cassette nach Gebrauch nicht abnehmen. Die Kappe der ELITE InGenius® PCR Cassette ist darauf ausgelegt, Kontaminationen zu verhindern.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken, rauchen und keine Kosmetikprodukte anwenden. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös und/oder biologisch gefährlich betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, des Transports, der Lagerung, Handhabung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Proben und Reagenzien müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. Persönliche Schutzausrüstung (PSA) verwenden, die den aktuellen Richtlinien für den Umgang mit potenziell infektiösen Proben entspricht. Abfall in Übereinstimmung mit den örtlichen und Landesvorschriften entsorgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) sind für VIASURE Real Time PCR Detection Kits aufgrund ihrer Einstufung als nicht gesundheits- und umweltgefährdend keine Sicherheitsdatenblätter erforderlich, da



Stoffe und/oder Gemische, die die in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP) festgelegten Kriterien für die Gefahreinstufung erfüllen, nicht darin enthalten sind bzw. in Konzentrationen vorliegen, die über dem in der genannten Verordnung festgelegten Wert für ihre Deklaration liegen.

- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Referenzhandbuch des jeweiligen Real-Time-PCR-Geräts.
- Ziehen Sie bezüglich weiterer Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise vor Gebrauch des VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® das ELITE InGenius® Benutzerhandbuch und den ELITE InGenius® Quick Reference Guide zurate.
- Bitte achten Sie darauf, dass Sie die aktuellste Version der ELITE InGenius® System-Software verwenden.

## 8. Testverfahren

### 8.1. Probenentnahme, -transport und -lagerung

Das VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® wurde für Stuhlproben validiert. Andere Arten von Proben müssen vom Benutzer validiert werden.

Die Entnahme, die Lagerung und der Transport von Proben sollte unter den vom Benutzer validierten Bedingungen erfolgen. Generell sollten Stuhlproben in sauberen Behältern gesammelt und entsprechend gekennzeichnet werden. Nach der Gewinnung sollten die Proben in einem Beutel für biogefährliche Materialien gegeben und so schnell wie möglich weitertransportiert und verarbeitet werden, um eine gute Qualität des Tests zu gewährleisten. Die Proben sollten gemäß den lokalen und nationalen Bestimmungen für den Transport von pathogenem Material und nicht länger als 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) oder 24 Stunden bei 2 bis 8 °C transportiert werden. Für den Langzeittransport (mehr als 24 Stunden) empfehlen wir Temperaturen von -20 °C oder darunter. Es wird empfohlen, frische Proben für den Test zu verwenden. Die Proben können bei 2 bis 8 °C bis zu 24 Stunden lang oder zur Konservierung bei -20 °C oder idealerweise bei -70 °C gefroren gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, um eine Schädigung der Proben und Nukleinsäuren zu vermeiden.

Die klinischen Proben müssen gemäß den entsprechenden Laborrichtlinien entnommen, transportiert und gelagert werden. Einzelheiten finden sich in den CDC-Leitlinien (Specimen Collection Guidelines). Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> und der IDSA-Leitlinie (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. Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Die Proben sind in sauberen Behältern zu sammeln und schnellstmöglich zu verarbeiten, um die Testqualität sicherzustellen. Wir empfehlen die Verwendung frischer Proben.

Für eine längere Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C bis -70 °C einzufrieren. In diesem Fall sind die Proben vollständig aufzutauen und vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur zu bringen. Die Stuhlproben vor der

Vorbereitung so gründlich wie möglich homogenisieren. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen wird nicht empfohlen.

Die Probenvorbereitung gemäß den in der Gebrauchsanweisung des verwendeten Extraktionskits ELITE InGenius® und dem ELITE InGenius® Quick Reference Guide und dem ELITE InGenius® Quick Reference Guide aufgeführten Empfehlungen durchführen. Bitte beachten Sie, dass andere Proben möglicherweise eine Vorbehandlung erfordern. Bei Stuhlproben das Protokoll „Stool sample: pre-treatment for bacterial and parasitic target with ELITE InGenius®“ (Stuhlproben: Vorbehandlung für bakterielle und parasitische Ziele) verwenden. Applikationsspezifische Vorbereitungsmaßnahmen für die Extraktion sind vom Benutzer zu bestimmen und zu validieren.

### 8.3. Extraktionskontrolle

Rekonstituieren Sie die Extraktionskontrolle (grünes Fläschchen), indem Sie 500 µl RNase/DNase-freies Wasser (weißes Fläschchen) hinzugeben und sie gründlich auf dem Vortex mischen. Überführen Sie die rehydrierte Extraktionskontrolle in das 0,5-ml-Röhrchen mit Stehrand und Schraubkappe (Sarstedt Ref.-Nr. 72.730.005).

### 8.4. Lyophilisierte Positivkontrolle

Da die *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control eine hohe Anzahl an Template-Kopien enthält, wird empfohlen, diese in einem separaten Laborbereich von anderen Komponenten entfernt zu öffnen und zu verarbeiten. Rekonstituieren Sie die lyophilisierte *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control (rotes Fläschchen), indem Sie 950 µl RNase/DNase-freies Wasser (weißes Fläschchen) hinzugeben und sie gründlich auf dem Vortex mischen.

Nachdem die Positivkontrolle resuspendiert wurde, sollte sie bei -20 °C gelagert werden. Empfehlenswert ist eine Aufteilung in Aliquote, um die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen zu minimieren

### 8.5. Röhrchen mit lyophilisiertem Reaction Mix

Bestimmen Sie die Anzahl der erforderlichen Reaktionen, einschließlich der Proben und Kontrollen (eine positive und eine negative Kontrolle müssen in jedem Durchlauf enthalten sein). Beschaffen Sie die richtige Anzahl Röhrchen mit lyophilisiertem Reaction-Mix tube (je 24 Reaktionen) für die Testung.

Es wird empfohlen, das Röhrchen mit dem *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix im Vor-PCR-Laborbereich zu öffnen und zu bearbeiten. Öffnen Sie das Röhrchen mit dem lyophilisierten Reaction-Mix tube (weißes Fläschchen) vorsichtig, um ein Aufbrechen des Pellets zu vermeiden, und geben Sie 390 µl des mitgelieferten Rehydration Buffer (blaues Fläschchen) hinzu. Durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig mischen. Drehen Sie das Gefäß kurz, um die beim Mischen entstandenen Blasen zu entfernen.

Nach dem Resuspendieren des Reaction-Mix tube die unbenutzten Reagenzien wieder bei geeigneten Lagerbedingungen (-20 °C) aufbewahren. Es empfiehlt sich eine Aufteilung in Aliquote, um die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen zu minimieren.

Hinweis: Die Menge des rehydrierten Reaction-Mix reicht für 24 Reaktionen. Das rehydrierte Reaction-Mix kann bis zu 4 Stunden lang bei 25 °C ± 5 °C oder 2–8 °C aufbewahrt werden (im Abschnitt „Transport- und Lagerungsbedingungen“ sind weitere Lagerungsmöglichkeiten aufgeführt).

## 8.6. PCR-Bedingungen

Hinweis: Ausführliche Anweisungen entnehmen Sie bitte dem ELITE InGenius® Benutzerhandbuch und dem ELITE InGenius® Quick Reference Guide.

### 8.6.1. PCR-Testprotokoll für das VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®

Das Produkt VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® kann mit dem ELITE InGenius® System für folgende Zwecke verwendet werden:

- A. Integrierter Lauf (Extraktion + PCR)
- B. Amplifikationslauf (Nur PCR)
- C. Extraktionslauf (Nur Extraktion)

Um einen integrierten Lauf (A) einzurichten, führen Sie mithilfe der graphischen Benutzeroberfläche (GUI) die folgenden Schritte aus.

- 1) Schalten Sie das Gerät ein und melden Sie sich mit Ihren Anmeldedaten an.
- 2) Wählen Sie „Perform Run“ (Lauf durchführen) im Bildschirm „Home“ (Start).

Hinweis: Überprüfen Sie, ob die Amplifikationskontrollen (Positivkontrolle und Negativkontrolle) in einem Lauf zusammen mit der zu verwendenden Charge des Amplifikationsreagenzes getestet wurden und nicht abgelaufen sind (Status). Wenn Sie nicht über gültige und freigegebene Amplifikationskontrollen verfügen, sollten die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Schritte durchgeführt werden.

- 3) Vergewissern Sie sich, dass das „Extracion Input Volume“ (Extraktionseingangsvolumen) 200 µl und das „Extracted Elute Volume“ (Extraktionseluatvolumen) 100 µl beträgt.
- 4) Scannen oder tippen Sie für jeden „Track“ (Spur) den Proben-Barcode ein.
- 5) Wählen Sie in der Spalte „Assay“ (Assay) das Assayprotokoll aus: VIASURE\_KGE\_00. Vergewissern Sie sich, dass Sie das Protokoll „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) ausgewählt haben.
- 6) Wählen Sie in der Spalte „Sample position“ (Probenposition) die Probenladeposition und anschließend „Extraction Tube“ (Extraktionsröhrchen).
- 7) Laden und überprüfen Sie alle erforderlichen Verbrauchsmaterialien und Reagenzien.
  - Laden Sie die Extraktionskontrolle und das *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix tube in den ausgewählten „Inventory Block“ (Bestandsblock), wobei Sie die Anweisungen auf der Benutzeroberfläche befolgen.
  - Laden und überprüfen Sie die Spitzen-Racks in der „Inventory Area“ (Bestandsbereich), wobei Sie die Anweisungen auf der Benutzeroberfläche befolgen.
  - Laden Sie die „PCR Cassettes“ (PCR-Kassetten), die ELITE InGenius® SP 200 Extraktionskartuschen, alle erforderlichen Verbrauchsmaterialien und die zu extrahierenden Proben, wobei Sie die Anweisungen auf der Benutzeroberfläche befolgen.
- 8) Schließen Sie die Klappe und starten Sie den Lauf.

9) Zeigen Sie die Ergebnisse an und genehmigen Sie sie.

Alle für die Sitzung erforderlichen Parameter sind im Assay-Protokoll, das auf dem Gerät verfügbar ist, eingeschlossen und werden automatisch aufgerufen, wenn das Assay-Protokoll ausgewählt wird.

Im Folgenden finden Sie eine Zusammenfassung der Programmeinstellungen:

- I. Name des Assay-Protokolls: VIASURE\_KGE\_00 bottom row
- II. Extraktion
  - a. Name der Extraktionskassette: ELITE InGenius® SP 200.
  - b. Extraktionseingangsvolumen: 200 µl
  - c. Extraktionseluatvolumen: 100 µl
- III. PCR
  - a. Gesamtvolumen: 20 µl
  - b. PCR-Template-Volumen: 5 µl
  - c. PCR-Protokollbedingungen:

Zyklen	Schritt	Zeit(en)	Temperatur
1	Initiale Denaturierung	120	95 °C
45	Denaturierung	10	95 °C
	Hybridisierung/Extension (Datenerfassung*)	50	60 °C

Tabelle 3. PCR-Protokoll.

- d. Lesen Sie den Fluoreszenzwert im Schritt „Annealing/Extension (Data collection\*)“ (Anlagerung/Extension (Datenerfassung\*)) ab. Fluoreszenzdaten sollten während des Extensionsschritts(\*) über die Kanäle für *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, *E. histolytica* und die Extraktionskontrolle erfasst werden.

Der Modus nur für PCR (B) umfasst alle oben erwähnten Schritte unter Berücksichtigung der folgenden Variationen:

- Schritt 3: Auch wenn keine Extraktion erfolgt, muss sichergestellt werden, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktionseingangsvolumen) 200 µl und das „Extraction Elute Volume“ (Extraktionseluatvolumen) 100 µl beträgt.
- Schritt 6: Wählen Sie „PCR only“ (Nur PCR) und geben Sie für die Probenposition „Elution tube“ (Elutionsröhrchen) ein.

Der Modus nur für Extraktion (C) umfasst alle oben erwähnten Schritte unter Berücksichtigung der folgenden Variationen:

- Schritt 3: Stellen Sie sicher, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktionseingangsvolumen) 200 µl und das „Extracted Elute Volume“ (Extraktionseluatvolumen) 100 µl beträgt.
- Schritt 6: Wählen Sie „Extraction only“ (Nur Extraktion) und entweder „Primary“ (Primäres Röhrchen) oder „Extraction tube“ (Extraktionsröhrchen) aus.

## 8.6.2. Einrichtung des ELITE InGenius® Instruments

Anweisungen zur Konfiguration des ELITE InGenius® System, einschließlich der Einrichtung des Geräts, der Durchführung eines Assays, des Ladens des Kartuschen- und Proben-Racks in das ELITE InGenius® System, der Überprüfung und Genehmigung von Ergebnissen, der Ausgabe der Ergebnisse, des Abschlusses des Laufs sowie der Wartung und des Herunterfahrens des Geräts finden Sie im ELITE InGenius®-Benutzerhandbuch und im ELITE InGenius® Quick Reference Guide.

## 9. Ergebnisinterpretation

**Nähere Angaben zur Auswertung von Daten erhalten Sie im Benutzerhandbuch des ELITE InGenius® Systems.**

Alle Testergebnisse müssen vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden. Überprüfen Sie das Signal der Extraktionskontrolle (EK), um die korrekte Funktionsweise des Extraktionsvorgangs und der Amplifikationsmischung sicherzustellen. Die Analyse der Kontrollen und Proben wird durch die Software des verwendeten Echtzeit-PCR-Geräts selbst gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Ergebnisse sind anhand der folgenden Tabellen 4 und 5 abzulesen und zu analysieren.

Verwenden Sie in jedem Durchlauf eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Beurteilen Sie die Reaktion, indem Sie das Fehlen eines Signals im Probengefäß der Negativkontrolle sowie das Vorhandensein eines Signals im Probengefäß mit der *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* & *E. histolytica* Positivkontrolle überprüfen. Für einen gültigen diagnostischen Testlauf müssen die folgenden Kontrollbedingungen erfüllt sein:

Kontrollen	<i>Cryptosporidium</i> <sup>1</sup>	<i>Giardia lamblia</i> <sup>1</sup>	<i>E. histolytica</i> <sup>1</sup>	Extraktionskontrolle	Interpretation der Kontrollen
<b>Positivkontrolle (PC)</b>	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv <sup>2</sup>	<b>Gültig</b>
<b>Negativkontrolle (NC)</b>	Negativ oder kein Signal	Negativ oder kein Signal	Negativ oder kein Signal	n. a.	<b>Gültig</b>

Tabelle 4. Erwartetes Ergebnis der Kontrollen. Kein Signal = keine Amplifikationskurve

**1** In Fällen, in denen einer oder beide Kontrolltests fehlgeschlagen sind (für einen beliebigen Zielkanal wird ein Amplifikationssignal im Negativkontroll- und/oder das Fehlen des Signals im Positivkontroll-Röhrchen beobachtet), werden alle Ergebnisse als „ungültig“ angegeben und es ist eine erneute Testung erforderlich.

**2** Die Extraktionskontrolle (EK) sollte ein Amplifikationssignal (positiv in den Positivkontroll-Wells (NC)) ergeben. Bei den Extraktionskontrollen können aufgrund des Extraktionsverfahrens Unterschiede in den Ct-Werten zwischen der Positivkontrolle und den klinischen Proben festgestellt werden.

Die Bewertung der Testergebnisse der klinischen Proben sollte erfolgen, nachdem die Positiv- und Negativkontrollen validiert und genehmigt wurden. Es sollte überprüft werden, ob die Amplifikations-Positivkontrolle und -Negativkontrolle mit der zu verwendenden Charge des Amplifikationsreagenzes durchgeführt wurden. Beide Kontrollergebnisse laufen nach 15 Tagen ab.

Wenn eine oder mehrere Kontrollen ungültig sind, können die Patientenergebnisse nicht interpretiert werden.

Verwenden Sie bei der Interpretation der Ergebnisse der Patientenproben die folgenden zum Ablesen und Analysieren der Ergebnisse:

<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	Extraktionskontrollen	Interpretation der einzelnen Patientenproben	
Positiv	Positiv	Positiv	Positiv oder kein Signal <sup>1</sup>	<b>Gültig</b>	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia lamblia</i> und <i>E. histolytica</i> Positiv
Negativ	Negativ	Negativ	Positiv	<b>Gültig</b>	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia lamblia</i> und <i>E. histolytica</i> Negativ
Positiv	Negativ	Negativ	Positiv oder kein Signal <sup>1</sup>	<b>Gültig</b>	<i>Cryptosporidium</i> Positiv, <i>Giardia lamblia</i> und <i>E. histolytica</i> Negativ
Positiv	Positiv	Negativ	Positiv oder kein Signal <sup>1</sup>	<b>Gültig</b>	<i>Cryptosporidium</i> und <i>Giardia lamblia</i> Positiv, <i>E. histolytica</i> Negativ
Positiv	Negativ	Positiv	Positiv oder kein Signal <sup>1</sup>	<b>Gültig</b>	<i>Cryptosporidium</i> und <i>E. histolytica</i> Positiv, <i>Giardia lamblia</i> Negativ
Negativ	Positiv	Negativ	Positiv oder kein Signal <sup>1</sup>	<b>Gültig</b>	<i>Giardia lamblia</i> Positiv, <i>Cryptosporidium</i> und <i>E. histolytica</i> Negativ
Negativ	Positiv	Positiv	Positiv oder kein Signal <sup>1</sup>	<b>Gültig</b>	<i>Giardia lamblia</i> und <i>E. histolytica</i> Positiv, <i>Cryptosporidium</i> Negativ
Negativ	Negativ	Positiv	Positiv oder kein Signal <sup>1</sup>	<b>Gültig</b>	<i>E. histolytica</i> Positiv, <i>Cryptosporidium</i> und <i>Giardia lamblia</i> Negativ
Negativ kein Signal	Negativ oder kein Signal	Negativ oder kein Signal	Negativ oder kein Signal <sup>2</sup>	<b>Fehlgeschlagen</b>	<b>Testversagen – Testung wiederholen <sup>2</sup></b> In der graphischen Benutzeroberfläche (GUI) des ELITE InGenius® System als „Ungültig“ angegeben.

Tabelle 5. Interpretation der Ergebnisse der Patientenprobe. Ct-Werte. Kein Signal = keine Amplifikationskurve.

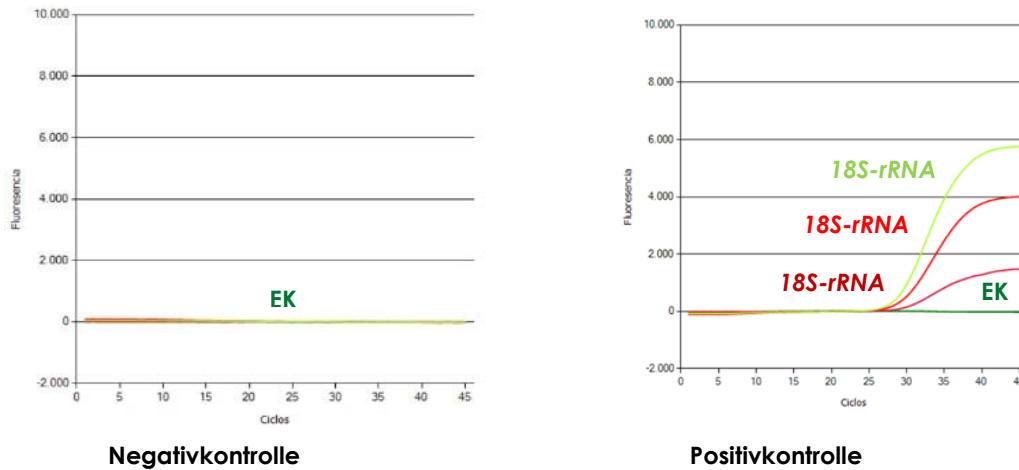
<sup>1</sup> Die Extraktionskontrolle (EK) zeigt ein Amplifikationssignal (Positiv oder kein Signal) oder nicht. Gelegentlich ist ihr Nachweis nicht notwendig, da das Vorliegen einer hohen Kopienzahl der Ziel-Nukleinsäure zu deren präferenzierter Amplifikation führen kann. Bei den Extraktionskontrollen können aufgrund des Extraktionsverfahrens Unterschiede in den Ct-Werten zwischen den Kontrollen und den klinischen Proben festgestellt werden.

<sup>2</sup> Für den Fall, dass die *Cryptosporidium*-, *Giardia lamblia*- und *E. histolytica*-Zielgene negativ sind, muss die EK ein Amplifikationssignal zeigen. Wenn kein Signal vorhanden ist oder der Ct-Wert der Extraktionskontrolle auf das Ergebnis Negativ hinweist, wird das Ergebnis als „ungültig“ betrachtet und der Test muss wiederholt werden. Es wird empfohlen, die RT-qPCR zu wiederholen, indem die DNA-Probe 1:10 und/oder 1:100 verdünnt wird, oder eine erneute Extraktion vorzunehmen und zu testen, um auf mögliche Fehler im Extraktionsverfahren und/oder Inhibitionsprobleme zu prüfen.

Im Fall eines weiterhin zweifelhaften Ergebnisses wird empfohlen, ELITE InGenius® Benutzerhandbuch und den ELITE InGenius® Quick Reference Guide zurate zu ziehen, um die ordnungsgemäße Ausführung des Extraktionsverfahrens,

aller RT-qPCR-Schritte sowie die Korrektheit der Parameter zu prüfen und zu kontrollieren, ob die Kurvenform sigmoid und die Intensität der Fluoreszenz angemessen ist.

Abbildung 1. Korrekter Kontrolllauf mit der Negativ- und der Positivkontrolle auf dem ELITE InGenius®.



## 10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden.
- Dieser Assay kann zwar mit verschiedenen Arten von Proben durchgeführt werden, jedoch wurde er bisher nur für aus menschlichen Stuhlproben extrahierte DNA validiert.
- Die Leistungsbewertungsmerkmale wurden gemäß dem PCR-Protokoll mit der Bezeichnung VIASURE\_KGE\_00 bewertet. Wird ein anderes Protokoll als das erwähnte verwendet, muss der Test vom Endbenutzer validiert werden.
- Um einen optimalen Ablauf des Tests zu gewährleisten, sollte sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Röhrchens befinden und nicht im oberen Bereich des Röhrchens oder an der Verschlussfolie haften. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- Zeigt das Reaktionsgemisch in stabilisierter Form, das sich in der Regel am Boden des Röhrchens befindet, ein anderes Erscheinungsbild als üblich (keine konische Form, Inhomogenität, kleineres/größeres Volumen und/oder eine andere Farbe als weißlich), hat dies keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Tests.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus den Stuhlproben extrahiert werden.
- Bei diesem Test handelt es sich um einen qualitativen Test, der weder quantitative Werte liefert noch die Anzahl vorliegender Keime angibt.
- Unter Umständen können extrem niedrige, unterhalb der Nachweisgrenze liegende Kopienzahlen der Zielsequenz nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse eventuell nicht reproduzierbar sind.
- Es besteht die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse aufgrund einer Kreuzkontamination durch *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und/oder *Entamoeba histolytica*, entweder durch die hohe Anzahl von cDNA-Template-Kopien, die das Fläschchen mit der *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica* Positive Control enthält, durch Proben, die hohe Konzentrationen an Ziel-DNA enthalten, oder aufgrund einer Kontaminierung durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.



- Zudem besteht die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer Kreuzkontamination zwischen der Extraktionskontrolle und der *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* & *Entamoeba histolytica* Positive Control, die eine hohe Anzahl an Template-Kopien enthält, während der Rekonstitution mittels Hinzufügung von RNase/DNase-freiem Wasser (weißes Fläschchen). Die verschiedenen Vorgänge sind in der vorgesehenen Reihenfolge und in getrennten Laborbereichen durchzuführen.
- Falsch negative Resultate können sich durch verschiedene Faktoren (auch in Kombinationen) wie die folgenden ergeben:
  - unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder der Handhabung von Proben;
  - unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich DNA-Extraktion);
  - Abbau der DNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben;
  - eine Bakterienlast in der Probe, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegt;
  - das Vorliegen von RT-qPCR-Inhibitoren oder anderer Arten von Störsubstanzen. Die Auswirkungen von Antibiotika, die zur Vorbeugung gegen *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und/oder *Entamoeba histolytica* oder während der Behandlung der Infektion eingesetzt werden, wurden nicht untersucht.
  - Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
 Im Zweifelsfall lesen Sie bitte in Abschnitt 9 nach, um die korrekte Interpretation der Ergebnisse zu prüfen.
- Ein negatives EK-Signal schließt das Vorhandensein von *Cryptosporidium*-, *Giardia lamblia*- und/oder *Entamoeba histolytica*-DNA in einer klinischen Probe nicht aus.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt an, dass lebensfähige Erreger vorliegen oder dass diese Erreger infektiös oder der Auslöser klinischer Symptome sind. Ein positives Ergebnis weist jedoch auf die Anwesenheit bakterieller Zielsequenzen hin (*18S-rRNA Gen*).
- Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und/oder *Entamoeba histolytica* nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen hinsichtlich der Patientenversorgung herangezogen werden. Die optimalen Probentypen und der optimale Zeitpunkt, zu dem bei Infektionen durch *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und/oder *Entamoeba histolytica* Spitzenwerte des Erregers vorliegen, sind noch nicht ermittelt worden. Zum Nachweis der Erreger kann die Entnahme mehrerer Proben (unterschiedlich nach Art und Zeitpunkt) desselben Patienten erforderlich sein.
- Wenn diagnostische Tests auf andere gastrointestinale Infekte negativ sind und das klinische Erscheinungsbild des Patienten sowie die epidemiologischen Informationen nahelegen, dass eine *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*- und/oder *Entamoeba histolytica*-Infektion möglich ist, sollte ein falsch negatives Ergebnis in Betracht gezogen und ein erneuter Test des Patienten erwogen werden.
- Die Fluoreszenzwerte können aufgrund verschiedener Faktoren variieren, wie z. B.: PCR-Gerät, Extraktionssystem, Art der Probe, vorherige Behandlung der Probe usw.

## 11. Qualitätskontrolle

Das VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® enthält jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle, die bei jedem Durchlauf mitgeführt werden müssen, um eine korrekte Ergebnisauswertung zu ermöglichen. Zudem dient die Extraktionskontrolle (EC) in jedem Probengefäß zum Nachweis der korrekten Durchführung der Technik.

## 12. Testeigenschaften

### 12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® wurde anhand von klinischen Stuhlproben von Patienten mit vermuteter gastrointestinaler Infektion untersucht.

Um die klinische Diagnosegenauigkeit zu bestimmen, wurden in Zusammenarbeit mit nationalen Einrichtungen verschiedene Bewertungen durchgeführt. Eine Zusammenfassung der Standorte, des Probenotyps und des Arbeitsablaufs ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Die Ergebnisse waren wie folgt:

	Standort	Probenotyp	Arbeitsablauf	Zielsequenz
1	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spanien)	Stuhlproben	ELITE InGenius® SP 200 + ELITE InGenius® System	<i>Cryptosporidium</i>
				<i>Giardia</i>
				<i>E. histolytica</i>

Tabelle 6. Standort, Probenotyp, Arbeitsablauf und Zielsequenzen.

Wahr positive und wahr negative Werte, falsch positive und falsch negative Werte sowie Sensitivität, Spezifität, PPV- und NPV-Wert beim VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® wurden in Relation zu verschiedenen Vergleichstests berechnet, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Standort	Vergleichstest	Zielsequenz	Gesamtübereinstimmung	TP	TN	FP	FN	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
1	Ziehl-Neelsen-Färbung und mikroskopische Visualisierung + 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> mit $CT_{cut-off}$	1 (0,97–1)	29	100	0	0	1 (0,88–1)	1 (0,96–1)	1 (0,85–1)	1 (0,95–1)

Tabelle 7. Wahrer positiver (TP) und wahrer negativer Wert (TN), falsch positiver (FP) und falsch negativer (FN) Wert, Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert (PPV) und negativer Vorhersagewert (NPV) für das VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.

\* Diskrepanze Proben wurden mit der molekularen Referenzmethode RIDA@GENE Bacterial Stool Panel (r-Bpahrm) getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass eine *Cryptosporidium*-Probe falsch positiv war. Bei Verwendung eines Cut-off-Wertes von 37,5 oder 37 (nur im Cy5-Kanal) verschwinden alle falsch positiven Werte.

Die Ergebnisse belegen eine hohe Übereinstimmung beim Nachweis von *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* und *E. histolytica* unter Verwendung des VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® zur Analyse von Stuhlproben.

### 12.2. Analytische Empfindlichkeit

Die Nachweisgrenze des VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® beträgt für *Cryptosporidium* 40 Kopien pro Reaktion, für *Giardia lamblia* 25 Kopien pro Reaktion und für *E. histolytica* 0,6 Zellen pro Reaktion.

### 12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des *Cryptosporidium*-, *Giardia lamblia*- und *E. histolytica*-Assays wurde durch Testen eines Panels verschiedener Mikroorganismen, die die häufigsten im Darm vorkommenden Krankheitserreger oder die Darmflora darstellen, bestätigt. Mit keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen wurde Kreuzreaktivität festgestellt.

Test auf Kreuzreaktionen					
<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enteropathogenic 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 O:3 y O:9</i>	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i>	-	<i>Enteroinvasive 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>	-	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	-	Astrovirus Genotype 1-8	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Enterohemorrhagic 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>Campilobacter hyointestinalis</i>	-	Coxsackievirus A24, A9 y B3	-		

Tabelle 8. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen.

## 12.4. Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® für *Giardia lamblia* wurde anhand von aus *Giardia intestinalis*-Kulturen extrahierter DNA bewertet (Synonym: *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*), wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

Die Reaktivität des VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® für *Entamoeba histolytica* wurde anhand von aus *Entamoeba histolytica* extrahierter DNA bewertet, wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

Die Reaktivität des VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® für *Cryptosporidium* wurde anhand von aus *Cryptosporidium parvum* extrahierter DNA bewertet, wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

## 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" (ejecutar) en la pantalla "Home" (inicio).

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 "Vía", escanear o ingresar los códigos de barras de la muestra.
- 5) Seleccionar el protocolo del ensayo en la columna "Assay" (ensayo): VIASURE\_KGE\_00. Se debe asegurar de que el protocolo seleccionado sea "Extract + PCR" (extracción + PCR).
- 6) Seleccionar la posición de carga de la muestra "Sample position" (posición de la muestra), y después seleccionar "Extraction tube" (tubo de extracción).

- 7) Cargar y verificar todos los consumibles y reactivos necesarios.
  - Cargar el control de extracción y el tubo *Cryptosporidium*, *Giardia* y *E. histolytica* Reaction-Mix tube en el "Inventory Block" (bloque de inventario) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz.
  - Cargar y comprobar los bastidores de puntas en el "Inventory Area" (área de inventario) 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" (solo PCR) (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" (solo PCR) y configurar la posición de la muestra como "Elution tube" (tubo de elución) (fila inferior).

El modo "Extraction only" (solo extracción) (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" (solo extracción) y "Primary o Extraction tube" (tubo primario o de extracción).

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

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

<sup>1</sup> 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 <sup>1</sup>	<b>Válido</b>	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	<b>Válido</b>	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> Negativo
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo o sin señal <sup>1</sup>	<b>Válido</b>	<i>Cryptosporidium</i> Positivo, <i>Giardia lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> Negativo
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo o sin señal <sup>1</sup>	<b>Válido</b>	<i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia lamblia</i> Positivo, y <i>E. histolytica</i> Negativo
Positivo	Negativo	Positivo	Positivo o sin señal <sup>1</sup>	<b>Válido</b>	<i>Cryptosporidium</i> y <i>E. histolytica</i> Positivo, y <i>Giardia lamblia</i> Negativo
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo o sin señal <sup>1</sup>	<b>Válido</b>	<i>Giardia lamblia</i> Positivo, <i>Cryptosporidium</i> y <i>E. histolytica</i> Negativo
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo o sin señal <sup>1</sup>	<b>Válido</b>	<i>Giardia lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> Positivo, <i>Cryptosporidium</i> Negativo
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo o sin señal <sup>1</sup>	<b>Válido</b>	<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 <sup>2</sup>	<b>No válido</b>	<b>Fallo en el test – Repetir test <sup>2</sup></b> Reportado como “no válido” en la interfaz gráfica de usuario (GUI) del sistema ELITE InGenius®.

Tabla 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

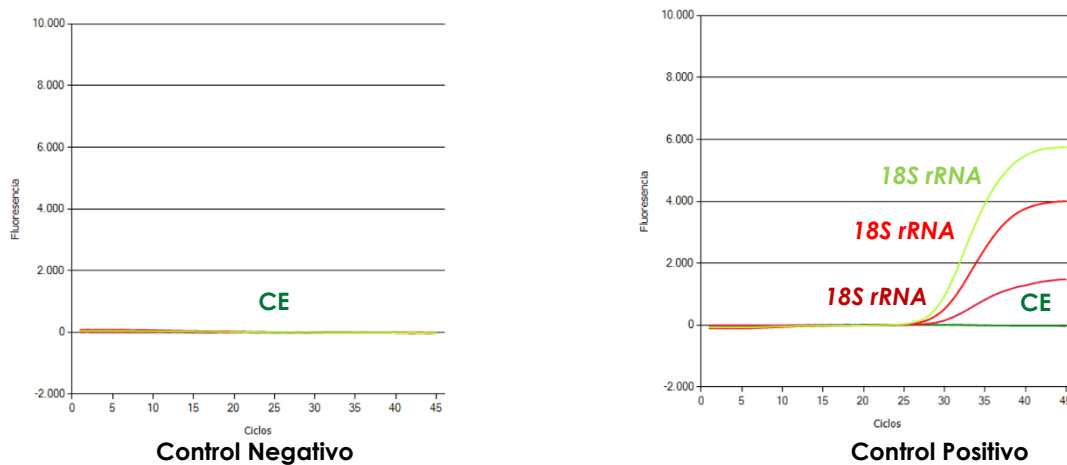


del control de extracción respecto a los obtenidos con el control negativo y positivo y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

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 "inválido" 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 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>	-	<i>Enteropathogenic 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>	-	<i>Enteroinvasive 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>	-	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	-	Astrovirus Genotype 1-8	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Enterohemorrhagic 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>Campilobacter 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* (sinónimos: *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.

## Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 <p>In-vitro- Diagnostikum Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>	 <p>Trocken aufbewahren Almacenar en lugar seco</p>	 <p>Verfallsdatum Fecha de caducidad</p>	 <p>Hersteller Fabricante</p>	 <p>Chargennummer Número de lote</p>
 <p>Siehe Gebrauchsanweisung ng Consultar las instrucciones de uso</p>	 <p>Temperaturbegrenzung Limitación de temperatura</p>	 <p>Ausreichend für &lt;n&gt; Test(s) Contiene &lt;n&gt; test</p>	 <p>Eindeutige Produktidentifikation Identificación única de dispositivo</p>	 <p>Katalognummer Número de referencia</p>

### Marken

Änderungsrechte vorbehalten. Alle Rechte vorbehalten. © CerTest Biotec, S.L.

Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erscheinen, sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

Die ELITE InGenius®-Technologie ist durch Patente und Patentanmeldungen geschützt.

Änderungshistorie / Control de Cambios		
Versionsnr. / Versión nº	Änderungen / Cambios	Datum / Fecha
00	Ursprüngliche Version / Versión original	13/01/2022

Table A 1. Tabelle Änderungshistorie / Tabla de Control de Cambios.

Revision: 13 Januar 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](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev01

