

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica
for ELITe InGenius®

CE IVD



Ces consignes d'utilisation s'appliquent aux références suivantes / Estas instrucciones de uso aplican para la siguiente referencia:

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

Tableau A 1. Référence du produit à utiliser avec ELITE InGenius®. / Referencia del producto para ser usado con ELITE InGenius®.

Table des matières

1.	Utilisation prévue	5
2.	Résumé et explication	5
3.	Procédé	5
4.	Réactifs fournis.....	6
5.	Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur.....	7
6.	Conditions de transport et de stockage	7
7.	Précautions pour les utilisateurs	8
8.	Protocole de test.....	9
8.1.	Prélèvement, transport et stockage des échantillons.....	9
8.2.	Préparation de l'échantillon et extraction de l'ADN	10
8.3.	Contrôle d'extraction	10
8.4.	Contrôle positif lyophilisé.....	10
8.5.	Tube lyophilisé réactionnel Reaction-Mix	10
8.6.	Conditions de PCR	11
8.6.1.	Programme de test PCR pour VIASURE <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®	11
8.6.2.	Préparation de l'instrument ELITE InGenius® Instrument.....	13
9.	Interprétation des résultats.....	13
10.	Limitations du test.....	15
11.	Contrôle qualité	16
12.	Caractéristiques du test.....	17
12.1.	Sensibilité et spécificité cliniques.....	17
12.2.	Sensibilité analytique	17
12.3.	Spécificité analytique	18
12.4.	Réactivité analytique	19

Contenido

1.	Usos previstos.....	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	31
12.	Características del test	32
12.1.	Sensibilidad y especificidad clínica	32
12.2.	Sensibilidad analítica	32
12.3.	Especificidad analítica	32
12.4.	Reactividad analítica	34
	Symboles pour les composants IVD et réactifs /Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	35
	Marques commerciales.....	35

FRANÇAIS

1. Utilisation prévue

Le VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® est un test de diagnostic in vitro automatisé conçu pour la détection qualitative de *Cryptosporidium, Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica* dans des échantillons fécaux humains provenant de patients présentant des signes et des symptômes d'infection gastro-intestinale. Ce test est destiné à faciliter le diagnostic de *Cryptosporidium, Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica* en combinaison avec des facteurs de risque cliniques et épidémiologiques. Le test est validé en association avec ELITE InGenius®, un système automatisé et intégré pour l'extraction, l'amplification et la détection d'acides nucléiques. L'ADN est extrait d'échantillons fécaux, multiplié par amplification en temps réel et détecté à l'aide d'amorces spécifiques et d'une sonde de marqueur rapporteur fluorescent pour *Cryptosporidium, Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica*.

2. Résumé et explication

Les protozoaires entériques restent les maladies parasitaires les plus fréquemment rencontrées qui affectent plusieurs millions de personnes chaque année et provoquent une morbidité et une mortalité importantes dans le monde entier. Parmi eux, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, et *Giardia lamblia* sont les principaux agents étiologiques.

Cryptosporidium peut être contractée de personne à personne, par contact avec des animaux de compagnie et d'élevage, par ingestion d'aliments, d'eau contaminée, qu'il s'agisse d'eau potable ou celle utilisée pour les loisirs. *Cryptosporidium* peut être présent de manière asymptomatique ou provoquer une diarrhée et un inconfort abdominal avec perte de poids et malabsorption. L'infection à *Giardia lamblia* se transmet par la voie fécale-orale, soit par contact direct, soit par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. La diarrhée est le symptôme prédominant de la maladie, avec toutefois des manifestations cliniques variables : allant des infections non symptomatiques aux diarrhées sévères, en passant par les crampes abdominales, les ballonnements et les flatulences, souvent accompagnées de nausées et d'une perte de poids. La maladie due à *Entamoeba histolytica* se transmet principalement par des aliments ou de l'eau contaminés par des kystes, mais peut également être transmise d'une personne à l'autre par voie fécale-orale. Les caractéristiques cliniques de l'amibiase vont de la colonisation asymptomatique (90 % des cas) à la dysenterie amibienne (douleurs d'estomac, nausées ou vomissements et diarrhée sévère avec selles sanglantes et glaireuses, fièvre) et aux maladies extra-intestinales invasives, le plus souvent sous forme d'abcès du foie.

La microscopie a été considérée comme la méthode de référence pour effectuer le diagnostic de ces parasites. Cependant, il s'agit d'un processus qui prend beaucoup de temps, présente un niveau faible de sensibilité et ne permet pas de distinguer le parasite pathogène invasif *E. histolytica* du parasite commensal *E. dispar*. Le test PCR en temps réel est moins laborieux et présente une sensibilité et une spécificité plus élevées, ce qui en fait une alternative intéressante.

3. Procédé

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® est conçu pour la détection qualitative de l'ADN de *Cryptosporidium, Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica* dans les échantillons fécaux. Après l'isolement de l'ADN, l'identification de ces pathogènes se fait par l'amplification d'une

région conservée du gène de l'ARNr 18S de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et *Entamoeba histolytica* respectivement, au moyen d'amorces spécifiques et d'une sonde marquée d'une molécule fluorescente.

Le VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® est basé sur l'activité d'exonucléase de 5' de l'ADN polymérase. Pendant l'amplification de l'ADN, cette enzyme clive la sonde reliée à la séquence de l'ADN complémentaire, séparant le quencher (colorant désactivateur) du rapporteur. Cette réaction entraîne une augmentation du signal de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de la matrice cible. Cette fluorescence est mesurée sur l'ELITE InGenius®.

Le VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® contient dans chaque puits tous les composants nécessaires pour effectuer un test PCR en temps réel (amorces/sondes spécifiques, dNTPS, tampon et polymérase) sous un format stabilisé, ainsi qu'un contrôle d'extraction pour surveiller l'inhibition de l'activité polymérase. L'ADN cible de *Cryptosporidium* est amplifié et détecté dans le canal Cy5, l'ADN cible de *Giardia lamblia* est amplifié et détecté dans le canal FAM, l'ADN cible de *Entamoeba histolytica* est amplifié et détecté dans le canal ROX et le contrôle d'extraction (CE) dans les canaux HEX, VIC ou JOE.

Cible	Canal ELITE InGenius®	Fluorophore compatible	Gène
<i>Cryptosporidium</i>	Ch 5	Cy5	ARNr 18S
<i>Giardia lamblia</i>	Ch 1	FAM	ARNr 18S
<i>Entamoeba histolytica</i>	Ch 4	ROX	ARNr 18S
Contrôle d'extraction (CE)	Ch 2	HEX, VIC ou JOE *	-

Tableau 1. Cible, canal et gènes.

4. Réactifs fournis

Le VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® contient les matériaux et réactifs décrits dans le Tableau 2 ci-après.

Réactif/matériau	Description	Couleur	Quantité
<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Reaction-Mix tube	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces, des sondes, un tampon, des dNTPs et des stabilisateurs sous forme stabilisée	Blanc	4 flacons
Rehydration Buffer (tampon de réhydratation)	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Bleu	1 flacon de 1,8 ml
Extraction Control (Contrôle d'extraction)	Acide nucléique non infectieux lyophilisé	Vert	1 flacon
<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Positive Control	ADN synthétique lyophilisé non infectieux	Rouge	1 flacon
Negative control (Contrôle négatif)	Contrôle sans matrice	Violet	1 flacon de 1 ml
Water RNase/DNase free (Eau exempte de RNase/DNase)	Eau exempte de RNase/DNase	Blanc	2 flacons de 1 ml

Tableau 2. Réactifs et matériaux inclus dans le kit VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®, réf. N°. VS-2340KGE196TE.

5. Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur

La liste suivante présente les matériaux et l'équipement qui sont nécessaires, mais qui ne sont pas inclus dans le kit de détection VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.

- Solution automatisée, de l'échantillon au résultat, conçue pour le diagnostic moléculaire : ELITE InGenius® Instrument (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030).
- Cartouche d'extraction « ELITE InGenius® SP 200 » (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- Consommables pour l'extraction et l'amplification « ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set » (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS),
- Cartouche d'amplification « ELITE InGenius® PCR Cassette » (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR),
- Embouts « 300 µL Filter Tips Axygen » (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S),
- Conteneurs « ELITE InGenius® Waste Box » (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000).
- Tube gainé à capuchon à vis Sarstedt 2,0 ml (Sarstedt Ref. 72.694.005).
- Tube gainé à capuchon à vis Sarstedt de 0,5 ml (Sarstedt Ref. 72.730.005).
- Tube conique 50 ml
- Système de collecte et préparation des échantillons.
- Congélateurs de laboratoire : - 30 °C à - 10 °C et/ou ≤ -70 °C.
- Microcentrifugeuse.
- Mélangeur Vortex.
- Micropipettes (0,5-20 µl, 20-200 µl).
- Embouts à filtre.
- Gants jetables sans poudre.
- Hotte à flux laminaire.

6. Conditions de transport et de stockage

- Les kits peuvent être expédiés et stockés à une température de 2 à 40 °C.
- Les kits peuvent être stockés à une température de 2 à 40 °C jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette, sauf le tube de Reaction-Mix réhydraté. Une fois que le tube de mélange réactionnel *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix tube a été reconstitué, il peut être conservé à 25°C±5°C ou entre 2°C et 8°C pendant 4 heures maximum. Pour des périodes plus longues, nous recommandons de le stocker à -20 °C et de le séparer en aliquotes pour minimiser les cycles de congélation-décongélation (jusqu'à 6 fois).
- Le mélange réactionnel Reaction-Mix réhydraté doit être rebouché et conservé dans le sachet avec un matériau déshydratant afin de le protéger de la lumière et de l'humidité.
- Une fois que le contrôle positif a été remis en suspension, conservez-le à une température de -20 °C. Nous recommandons de le séparer en aliquotes pour minimiser les cycles de congélation-décongélation. Un contrôle positif a été validé comme étant encore stable après 6 cycles de congélation et de décongélation.
- Protégez les composants contre les rayons du soleil.

7. Précautions pour les utilisateurs

- Le produit est destiné à être utilisé par du personnel de laboratoire clinique qualifié et formé, spécifiquement instruit et formé aux techniques de PCR en temps réel, de génétique humaine et de procédures de diagnostic *in vitro* (notamment la formation sur ELITE InGenius®).
- Pour les procédures diagnostiques *in vitro*.
- N'utilisez pas les réactifs et/ou matériaux après la date de péremption.
- N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle la boîte extérieure est déchirée.
- N'utilisez pas les réactifs dont la poche de protection est ouverte ou endommagée à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs dont les poches de protection sont ouvertes ou fissurées à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs sans absorbeur d'humidité ou si celui-ci est cassé à l'intérieur des poches de réactifs.
- Ne retirez pas l'absorbeur d'humidité des poches de réactifs après ouverture.
- Refermez rapidement les poches de réactifs avec la fermeture à glissière étanche après chaque utilisation. Expulsez tout excès d'air des poches avant de les refermer.
- N'utilisez pas les réactifs dont l'opercule en aluminium est cassé ou endommagé.
- Ne mélangez pas des réactifs provenant de poches, de kits, de lots et/ou de fournisseurs différents.
- Protégez les réactifs contre l'humidité. Toute exposition prolongée à l'humidité risque d'altérer l'efficacité du produit.
- Une apparence du mélange réactionnel au format stabilisé, se trouvant normalement au fond du tube, différente de celle habituelle (sans forme conique, inhomogène, de taille plus petite/plus grande et/ou de couleur autre que blanchâtre) n'altère pas la fonctionnalité du test.
- Élaborez un flux de travail unidirectionnel. Il doit commencer dans la zone d'extraction, puis se déplacer vers la zone d'amplification et de détection. Ne ramenez pas les échantillons, l'équipement et les réactifs dans la zone où s'est déroulée l'étape précédente. Utilisez des zones séparées pour effectuer la préparation des échantillons de patients et celle des contrôles afin d'éviter les résultats faux positifs.
- Si d'autres tests PCR sont menés dans la même zone commune du laboratoire, assurez-vous que le VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®, la cartouche d'extraction ELITE InGenius® SP 200, tout réactif supplémentaire requis pour le test et le ELITE InGenius® ne sont pas contaminés. Assurez-vous de toujours éviter tout risque de contamination microbienne et par ribonucléase (RNase)/désoxyribonucléase (DNase) des réactifs. L'utilisation d'embouts de pipette stériles, exempts de RNase/DNase, à usage unique, résistant aux aérosols ou à déplacement positif est fortement recommandée. Utilisez un nouvel embout pour chaque échantillon. Changez de gants avant toute manipulation de réactifs et de cartouches.
- Assurez-vous que la cartouche d'extraction ELITE InGenius® SP 200 et ELITE InGenius® PCR Cassette sont correctement assemblées (voir les consignes d'utilisation de ELITE InGenius® Ref. INT030).
- Pour éviter toute contamination de l'environnement par des amplicons, abstenez-vous d'enlever le capuchon de la ELITE InGenius® PCR Cassette après utilisation. Le capuchon de la ELITE InGenius® PCR Cassette est conçu pour empêcher toute contamination.
- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire. Portez des vêtements de protection, utilisez des gants, lunettes de protection et masque jetables. Abstenez-vous de manger, de fumer ou d'appliquer des produits cosmétiques dans la zone de travail. Lavez-vous les mains une fois que vous avez terminé le test.
- Traitez les échantillons, ainsi que tout réactif et tout matériau ayant été exposés à ces derniers, comme des agents potentiellement infectieux et/ou présentant un danger biologique, et manipulez-les conformément

aux réglementations nationales applicables en matière de sécurité. Prenez les précautions nécessaires pendant la collecte, le transport, le stockage, la manipulation et l'élimination des échantillons.

- Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés dans une enceinte de sécurité biologique. Utilisez un équipement de protection individuelle (EPI) conforme aux directives en vigueur pour la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux. Éliminez les déchets conformément aux réglementations locales et nationales.
- Une décontamination régulière de l'équipement fréquemment utilisé est recommandée, en particulier des micropipettes et des surfaces de travail.
- Conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 (REACH), les VIASURE Real Time PCR Detection Kits ne font pas l'objet de fiches de données de sécurité (Safety Data Sheets) dans la mesure où ils sont classés comme produits non dangereux pour la santé et l'environnement, dès lors qu'ils ne contiennent aucune substance et/ou composition correspondant aux critères de classification des dangers énoncés dans le règlement (CE) n° 1272/2008 (CLP) ou dont la concentration est supérieure à la valeur établie dans ledit règlement à des fins de déclaration.
- Consultez le manuel de référence de chaque instrument PCR en temps réel pour en savoir plus sur les avertissements, précautions et procédures à respecter.
- Consultez le mode d'emploi de ELITe InGenius® et le guide de référence « ELITe InGenius® Quick Reference Guide » pour mieux connaître les avertissements, précautions et procédures supplémentaires avant d'utiliser le VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITe InGenius®.
- Assurez-vous que le logiciel du système ELITe InGenius® System est la dernière version mise à jour.

8. Protocole de test

8.1. Prélèvement, transport et stockage des échantillons

Le VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITe InGenius® a été validé sur des échantillons fécaux. Tout autre type d'échantillon doit être validé par l'utilisateur.

La collecte, le stockage et le transport des échantillons doivent être conformes aux conditions validées par l'utilisateur. En règle générale, les échantillons de matières fécales doivent être collectés et étiquetés de manière appropriée dans des récipients propres. Une fois le prélèvement effectué, les spécimens doivent être placés dans un sac à risques biologiques et doivent être transportés et le traitement doit avoir lieu le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les échantillons doivent être transportés à température ambiante jusqu'à 2 heures, ou une température de 2 à 8 °C jusqu'à 24 heures maximum, conformément aux réglementations locales et nationales relatives au transport de matières porteuses d'agents pathogènes. Pour un transport de longue durée (plus de 24 heures), nous recommandons une expédition à une température ≤ -20 °C. Il est recommandé d'utiliser des spécimens frais pour le test. Les échantillons peuvent être stockés entre 2 et 8 °C jusqu'à 24 heures ou congelés à -20 °C ou idéalement à -70 °C pour la conservation. Évitez les cycles de congélation et de décongélation répétés afin de ne pas dégrader l'échantillon et les acides nucléiques.

Les échantillons cliniques doivent être prélevés, transportés et stockés conformément aux directives spécifiques du laboratoire. Pour en savoir plus, veuillez consulter la directive CDC (Centres pour le contrôle et la prévention des maladies) (Directives relatives au prélèvement d'échantillons, Site web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) et la directive IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). Guide de l'utilisation du laboratoire de microbiologie pour le diagnostic

des maladies infectieuses : mise à jour 2018 par la Société américaine des maladies infectieuses et la Société américaine de microbiologie. *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. Préparation de l'échantillon et extraction de l'ADN

D'une manière générale, les échantillons fécaux doivent être prélevés dans des conteneurs propres et traités le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Nous recommandons d'utiliser des échantillons frais.

Pour une durée de stockage plus longue, les échantillons doivent être congelés entre -20°C et -70°C. Le cas échéant, l'échantillon sera par la suite totalement décongelé et ramené à température ambiante avant d'être testé. Homogénéisez l'échantillon de matières fécales aussi soigneusement que possible avant la préparation. Il n'est pas recommandé d'effectuer plusieurs cycles de congélation et de décongélation.

Préparez l'échantillon selon les recommandations figurant dans le mode d'emploi du kit d'extraction utilisé, ELITE InGenius® et « ELITE InGenius® Quick Reference Guide ». Veuillez noter qu'un prétraitement peut s'avérer nécessaire pour certains échantillons. Pour les échantillons fécaux, utilisez le protocole « Échantillons fécaux : prétraitement pour cible bactérienne et parasitaire avec le protocole ELITE InGenius® ». L'utilisateur devra élaborer et valider des procédures de préparation de l'extraction spécifiques à l'application.

8.3. Contrôle d'extraction

Reconstituez le contrôle d'extraction (flacon vert) en ajoutant 500 µl d'eau exempte de RNase/DNase (flacon blanc) et mélangez au vortex soigneusement. Transférez le contrôle d'extraction dans le tube gainé à capuchon à vis de 0,5 ml (Sarstedt Ref. 72.730.005).

8.4. Contrôle positif lyophilisé

Cryptosporidium, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control contient une quantité élevée de la matrice, il est recommandé de l'ouvrir et de le manipuler dans une zone séparée du laboratoire, bien à l'écart des autres composants. Reconstituez le contrôle positif *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control (flacon rouge) en ajoutant 950 µl d'eau exempte de RNase/DNase (flacon blanc) et mélangez au vortex soigneusement.

Une fois que le contrôle positif a été remis en suspension, conservez-le à une température de -20 °C. Nous recommandons de le séparer en aliquotes pour minimiser les cycles de congélation-décongélation.

8.5. Tube lyophilisé réactionnel Reaction-Mix

Déterminez le nombre de réactions requises, notamment les échantillons et les contrôles (un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série). Prenez le nombre correct de flacons de Reaction-Mix lyophilisés (24 réactions chacun) pour les tests.

Il est recommandé d'effectuer l'ouverture et la manipulation du tube *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Reaction-Mix tube dans la zone de laboratoire pré-PCR. Ouvrez avec précaution le tube de mélange réactionnel lyophilisé Reaction-mix (flacon blanc) pour éviter de perturber le culot et ajoutez 390µl de tampon de réhydratation - Rehydratation Buffer (flacon bleu) - fourni. Mélangez doucement en utilisant la pipette selon un cycle aspiration/extraction. Faites tourner brièvement pour éliminer les bulles générées pendant le mélange.

Une fois que le tube de Reaction-Mix a été remis en suspension, remettez les réactifs non utilisés dans les conditions de stockage appropriées à -20°C. Nous recommandons de les séparer en aliquotes pour minimiser les cycles de congélation-décongélation.

Remarque : Ce volume de Reaction-Mix réhydraté est suffisant pour 24 réactions. Le mélange réactionnel réhydraté peut être conservé à 25°C±5°C ou 2-8°C pendant 4 heures maximum (voir la section « Conditions de transport et de stockage » pour connaître des options de stockage supplémentaires).

8.6. Conditions de PCR

Remarque : Consultez le mode d'emploi de ELITE InGenius® et le guide de référence « ELITE InGenius® Quick Reference Guide » pour mieux connaître les instructions détaillées.

8.6.1. Programme de test PCR pour VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®

Le produit VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® peut s'utiliser avec le système ELITE InGenius® System pour réaliser :

- A. un cycle intégré (Extraction + PCR)
- B. un cycle d'amplification (PCR uniquement)
- C. un cycle d'extraction (Extraction uniquement)

Pour configurer un cycle intégré (A), exécutez les étapes suivantes sur l'interface utilisateur graphique (GUI).

- 1) Mettez l'instrument sous tension et connectez-vous avec vos informations d'identification.
- 2) Sélectionnez *Perform Run* (Exécuter cycle) à partir de l'écran *Home* (Accueil).

Remarque : Vérifiez que les contrôles d'amplification (contrôle positif et contrôle négatif) ont été effectués et n'ont pas dépassé leur période d'expiration (état) avec le lot de réactifs d'amplification à utiliser. Si vous ne disposez pas de contrôles d'amplification valides et approuvés, ils doivent être effectués comme indiqué dans les sections suivantes.

- 3) Vérifiez que le « Extraction Input Volume » (Volume d'entrée de l'extraction) est de 200 µl et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µl.
- 4) Pour chaque « Track » (Circuit d'exécution), scannez ou saisissez les codes-barres de l'échantillon.
- 5) Sélectionnez le protocole d'analyse dans la colonne « Assay » (Analyse) : VIASURE_KGE_00. Assurez-vous que le protocole sélectionné est « *Extract + PCR* » (Extraction + PCR).

- 6) Sélectionnez la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « *Sample position* » (Position échantillon), puis sélectionnez « *Extraction Tube* » (Tube extraction).
- 7) Chargez et vérifiez la présence de tous les consommables et réactifs nécessaires.
 - Chargez le contrôle d'extraction et le tube *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Reaction-Mix tube dans le « *Inventory Block* » (Bloc Inventaire) sélectionné en suivant les instructions figurant sur l'interface.
 - Chargez et vérifiez les racks à embouts dans la « *Inventory Area* » (Zone inventaire) sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique.
 - Chargez les « *Cassettes PCR* », les cartouches d'extraction « *ELITE InGenius® SP 200* », tous les consommables requis et les échantillons à extraire, en suivant les instructions de l'interface graphique.
- 8) Fermez la porte et lancez l'exécution du cycle.
- 9) Consultez et approuver les résultats.

Tous les paramètres nécessaires à la session sont inclus dans le protocole de test disponible sur l'instrument et sont automatiquement rappelés lorsque le protocole de test est sélectionné.

Un résumé des paramètres du programme est présenté ci-dessous :

- I. Nom du protocole d'essai : VIASURE_KGE_00.
- II. Extraction
 - a. Nom de la Cassette d'extraction : ELITE InGenius® SP 200.
 - b. Volume d'entrée de l'extraction : 200 µl
 - c. Volume d'élution extrait : 100 µl
- III. PCR
 - a. Volume de réaction total : 20 µl
 - b. Volume de matrice PCR : 5 µl
 - c. Conditions du protocole PCR

Cycles	Étape	Temps	Température
1	Dénaturation initiale	120	95 °C
45	Dénaturation	10	95 °C
	Appariement/extension (Collecte de données*)	50	60 °C

Tableau 3. Protocole PCR.

- d. Lisez la mesure de fluorescence de l'étape « *Annealing/Extension (Data collection*)* » (Appariement/extension (Collecte de données*)) Les données fluorogéniques doivent être collectées au cours de l'étape d'extension (*) par le biais des canaux *Cryptosporidium, Giardia lamblia, E. histolytica* et Contrôle d'extraction.

Le mode PCR uniquement (B) implique toutes les étapes mentionnées ci-dessus en considérant les variations suivantes :

- Étape 3 : Même si l'extraction n'a pas lieu, vérifiez que le « *Extraction Input Volume* » (Volume d'entrée de l'extraction) est de 200 µl et que le « *Extracted Elute Volume* » (Volume d'élution extrait) est de 100 µl.

- Étape 6 : Sélectionnez « *PCR only* » (*PCR uniquement*) et assignez la position de l'échantillon sur « *Elution tube* » (Tube d'élution) (ligne du bas).

Le mode Extraction uniquement (C) implique toutes les étapes mentionnées ci-dessus en considérant les variations suivantes :

- Étape 3 : Vérifiez que le « *Extraction Input Volume* » (Volume d'entrée de l'extraction) est de 200 µl et que le « *Extracted Elute Volume* » (Volume d'élution extrait) est de 100 µl.
- Étape 6 : Sélectionnez « *Extraction only* » (Extraction uniquement) soit sur « *Primary* » (Primaire) ou « *Tube d'extraction* » (Tube d'extraction).

8.6.2. Préparation de l'instrument ELITE InGenius® Instrument

Pour visualiser des instructions sur la configuration du système ELITE InGenius® System, notamment la configuration de l'instrument, l'exécution d'un essai, le chargement du portoir de cartouches et du portoir d'échantillons sur ELITE InGenius®, l'examen et l'approbation des résultats, la sortie des résultats, la fin de l'essai et la maintenance, et l'arrêt de l'instrument, reportez-vous au manuel de l'utilisateur d'ELITE InGenius® et au guide de référence rapide « ELITE InGenius® Quick Reference Guide ».

9. Interprétation des résultats

Pour plus de détails sur la manière d'analyser et d'approuver les données, veuillez consulter le mode d'emploi du ELITE InGenius® User's Manual.

Tous les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques. Vérifiez le signal du contrôle d'extraction (CE) pour vous assurer du fonctionnement correct de la procédure d'extraction et/ou du mélange d'amplification. L'analyse des contrôles et des échantillons est effectuée par le logiciel de l'équipement PCR selon les instructions du fabricant. Lisez et analysez les résultats à l'aide des tableaux 4 et 5 suivants.

L'utilisation de contrôles positifs et négatifs à chaque cycle, permet de valider la réaction en vérifiant l'absence de signal dans le tube de contrôle négatif et la présence de signal pour *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et *E. histolytica* dans le tube de contrôle positif. Pour un test de diagnostic valide, les conditions de contrôle suivantes doivent être remplies :

Contrôles	<i>Cryptosporidium</i> ¹	<i>Giardia lamblia</i> ¹	<i>E. histolytica</i> ¹	Contrôle d'extraction	Interprétation des contrôles
Contrôle positif (CP)	Positif	Positif	Positif	Positif ²	Valide
Contrôle négatif (CN)	Négatif ou aucun signal	Négatif ou aucun signal	Négatif ou aucun signal	n.a.	Valide

Tableau 4. Performance attendue des contrôles. Pas de signal = pas de courbe d'amplification.

1 Dans les situations où l'un ou l'autre des contrôles, ou les deux, n'ont produit aucun résultat (échec) (un signal d'amplification est observé dans le contrôle négatif et/ou absence de signal dans le tube de contrôle positif pour tout canal cible), tous les résultats doivent être signalés comme « non valides » et la réalisation d'un nouveau test est nécessaire.

2 Le Contrôle d'extraction (CE) doit présenter un signal d'amplification (valeur positive dans le puits de contrôle positif (CP)). Des différences peuvent être observées au niveau des valeurs de Ct dans les contrôles d'extraction entre le contrôle positif et les échantillons cliniques, en raison du processus d'extraction.

L'évaluation des résultats des tests sur les échantillons cliniques doit être effectuée après que les contrôles positifs et négatifs ont été validés et approuvés. Il convient de vérifier que le contrôle positif et le contrôle négatif de l'amplification ont été réalisés avec le lot de réactif d'amplification à utiliser. Les résultats des deux contrôles expirent après une période de 15 jours.

Si un ou plusieurs contrôles ne sont pas valides, les résultats du patient ne peuvent pas être interprétés.

Pour réaliser l'interprétation des résultats des échantillons individuels des patients, utilisez les critères suivants pour lire et analyser les résultats :

<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	Contrôle d'extraction	Interprétation pour les échantillons individuels des patients	
Positif	Positif	Positif	Positif ou aucun signal ¹	Valide	Positif pour <i>Cryptosporidium</i>, <i>Giardia lamblia</i> et <i>E. histolytica</i>
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Valide	Négatif pour <i>Cryptosporidium</i>, <i>Giardia lamblia</i> et <i>E. histolytica</i>
Positif	Négatif	Négatif	Positif ou aucun signal ¹	Valide	Positif pour <i>Cryptosporidium</i> et Négatif pour <i>Giardia lamblia</i> et <i>E. histolytica</i>
Positif	Positif	Négatif	Positif ou aucun signal ¹	Valide	Positif pour <i>Cryptosporidium</i>, et <i>Giardia lamblia</i> et négatif pour <i>E. histolytica</i>
Positif	Négatif	Positif	Positif ou aucun signal ¹	Valide	Positif pour <i>Cryptosporidium</i>, et <i>E. histolytica</i> et négatif pour <i>Giardia lamblia</i>
Négatif	Positif	Négatif	Positif ou aucun signal ¹	Valide	Positif pour <i>Giardia lamblia</i> et négatif pour <i>Cryptosporidium</i> et <i>E. histolytica</i>
Négatif	Positif	Positif	Positif ou aucun signal ¹	Valide	Positif pour <i>Giardia lamblia</i> et <i>E. histolytica</i> et négatif pour <i>Cryptosporidium</i>
Négatif	Négatif	Positif	Positif ou aucun signal ¹	Valide	Négatif pour <i>Cryptosporidium</i>, et <i>Giardia lamblia</i> et positif pour <i>E. histolytica</i>
Négatif aucun signal	Négatif ou aucun signal	Négatif ou aucun signal	Négatif ou aucun signal ²	Non Valide	Défaillance de la procédure d'analyse – Répétez la procédure ² Indiqué comme « Invalid » (Non valide) sur l'interface utilisateur graphique (GUI) de l'application ELITE InGenius® System.

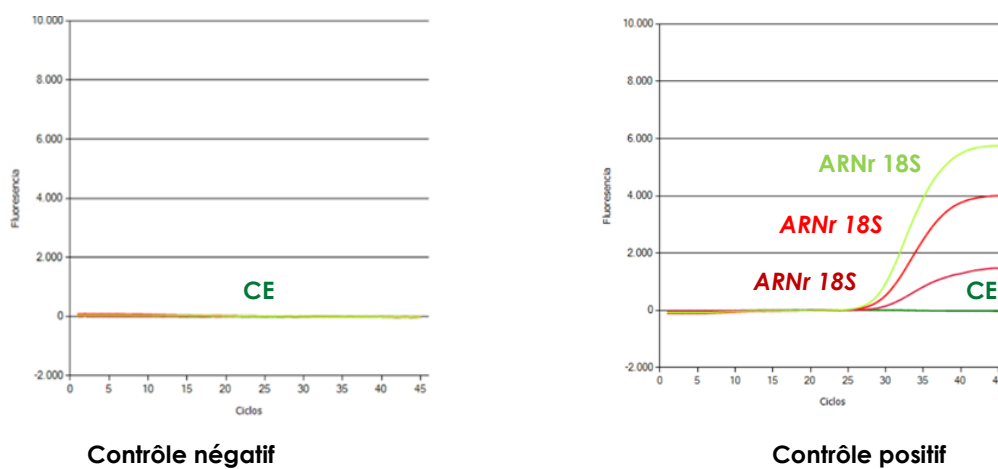
Tableau 5. Interprétation des résultats des échantillons des patients. Valeurs de Contrôle. Pas de signal = pas de courbe d'amplification

¹ Le Contrôle d'extraction (CE) présente, ou non, un signal d'amplification (valeur positive ou aucun signal). Parfois, cette détection ne s'avère pas nécessaire parce qu'un nombre élevé de copies de la cible peut entraîner une amplification préférentielle des acides nucléiques spécifiques à la cible. Des différences peuvent être observées au niveau des valeurs de Ct dans les contrôles d'extraction entre les contrôles et les échantillons cliniques, en raison du processus d'extraction.

2 Dans le cas de sites cibles négatifs pour les gènes de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et *E. histolytica*, le CE doit afficher un signal d'amplification. En l'absence de signal ou en cas de valeur Ct négative du contrôle d'extraction, le résultat est jugé « non valide » et un nouveau test est exigé. Il est recommandé de répéter la procédure RT-qPCR en diluant l'échantillon d'ADN au 1:10 et/ou au 1:100, ou de procéder à une nouvelle extraction et à un nouveau test pour vérifier l'absence de défaillance éventuelle au niveau de la procédure d'extraction et/ou de problèmes d'inhibition.

Si le résultat reste ambigu, il est recommandé de revoir le mode d'emploi de ELITE InGenius® ainsi que le guide de référence rapide « ELITE InGenius® Quick Reference Guide », pour vérifier que le processus d'extraction mis en œuvre a été bien réalisé, la bonne exécution de chaque étape du RT-qPCR et de revoir les paramètres, et enfin, de vérifier la forme sigmoïde de la courbe et l'intensité de la fluorescence.

Figure 1. Exécution correcte du contrôle négatif et du contrôle positif sur ELITE InGenius®.



10. Limitations du test

- Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- Bien que ce test soit compatible avec d'autres types d'échantillons, il a été validé avec de l'ADN d'échantillons fécaux humains.
- Les caractéristiques d'évaluation des performances ont été évaluées selon le protocole PCR nommé : VIASURE_KGE_00. En cas d'utilisation d'un autre protocole que celui mentionné, le test doit être validé par l'utilisateur final.
- Pour une bonne exécution du test, le produit lyophilisé doit se trouver au fond du tube et ne pas adhérer à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve intégralement au fond du tube.
- Une apparence du mélange réactionnel au format stabilisé, se trouvant normalement au fond du tube, différente de celle habituelle (sans forme conique, inhomogène, de taille plus petite/plus grande et/ou de couleur autre que blanchâtre) n'altère pas la fonctionnalité du test.
- La qualité du test dépend de la qualité des échantillons ; l'acide nucléique doit être extrait de manière correcte des échantillons fécaux.
- Ce test est un test qualitatif. En tant que tel, il ne fournit pas de valeurs quantitatives ni n'indique le nombre d'organismes présents.

- Il est possible que soient détectés des niveaux très faibles de cibles, inférieurs à la limite de détection, mais que les résultats ne soient pas reproductibles.
- Il existe du possibilité de résultats faux positifs dus à une contamination croisée avec *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica*, soit en raison de la quantité élevée de copies de matrice d'ADN contenues dans chacun des flacons de contrôle positif de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* & *Entamoeba histolytica*, des échantillons comportant de fortes concentrations de matrice d'ADN cible ou à cause d'une contamination par transmission à partir de produits PCR utilisés au cours d'analyse antérieures.
- Il existe la possibilité de faux positifs dus à une contamination croisée entre le contrôle d'extraction et le contrôle positif de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* & *Entamoeba histolytica* qui comporte une quantité importante de copies de matrice, au cours de leur procédure de reconstitution au moment de l'ajout d'eau exempte de RNase/DNase (flacon blanc). Chaque procédure doit se dérouler dans un ordre établi et dans une zone de laboratoire distincte.
- Les résultats faux négatifs peuvent être le fait de plusieurs facteurs et de leurs combinaisons, notamment :
 - Des méthodes de prélèvement, de transport, de stockage et/ou de manipulation des échantillons inappropriées.
 - Des procédures de traitement inappropriées (notamment l'extraction d'ADN).
 - La dégradation de l'ADN durant l'expédition, le stockage et/ou le traitement de l'échantillon.
 - Une charge bactérienne dans l'échantillon inférieure à la limite de détection pour le test.
 - La présence d'inhibiteurs de RT-qPCR ou d'autres types de substances interférentes. L'impact des antibiotiques utilisés pour prévenir la présence de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica* ou utilisés pendant le traitement de l'infection n'a pas été évalué.
 - Le non-respect des consignes d'utilisation et de la procédure de test.
En cas de doute, reportez-vous à la section 9 pour vérifier l'interprétation correcte des résultats.
- Un signal CE négatif n'exclut pas la présence d'ADN de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica* dans un échantillon clinique.
- Un résultat de test positif ne traduit pas nécessairement la présence de pathogènes viables et n'implique pas que ceux-ci soient infectieux ou soient les agents responsables des symptômes cliniques. Toutefois, un résultat positif indique la présence de séquences bactériennes cibles (gène ARNr 18S).
- Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par le *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica* et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient. Les types d'échantillons et le moment optimaux pour les pics de concentration virale pendant les infections causées par le *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica* n'ont pas été déterminés. Le prélèvement de plusieurs échantillons (types et moments) sur un même patient peut s'avérer nécessaire pour détecter les pathogènes.
- Si les tests de diagnostic d'autres maladies gastro-intestinales sont négatifs et que la présentation clinique du patient et les informations épidémiologiques suggèrent que l'infection par le *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et/ou *Entamoeba histolytica* est possible, il convient alors d'envisager un résultat faux négatif et de discuter d'un nouveau test pour le patient.
- Les mesures de fluorescence peuvent varier en raison de multiples facteurs tels que : Équipement PCR, système d'extraction, type d'échantillon, traitement préalable de l'échantillon, etc... entre autres.

11. Contrôle qualité

Le VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® comporte un contrôle positif et un contrôle négatif qui doivent être inclus dans le cycle d'analyse pour pouvoir interpréter les

résultats correctement. De plus, le contrôle d'extraction (CE) dans chaque tube à échantillons confirme que la technique a été exécutée correctement.

12. Caractéristiques du test

12.1. Sensibilité et spécificité cliniques

La performance clinique VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® a été testée à partir d'échantillons fécaux cliniques provenant de patients suspectés d'infection gastro-intestinale.

Afin de déterminer la précision du diagnostic clinique, différentes évaluations ont été réalisées en collaboration avec des entités nationales. Une synthèse des sites, du type d'échantillon et du flux de travail est présentée dans le tableau suivant. Les résultats étaient les suivants :

	Site	Type d'échantillon	Flux de travail	Cible
1	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain)	Écouvillons fécaux	ELITE InGenius® SP 200 + ELITE InGenius® System	<i>Cryptosporidium</i>
				<i>Giardia</i>
				<i>E. histolytica</i>

Tableau 6. Site, type d'échantillon, flux de travail et cible.

Les valeurs positives et négatives vraies, les valeurs positives et négatives fausses, la sensibilité, la spécificité, PPV et NPV pour VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® ont été calculées par rapport à chaque test comparateur, comme indiqué dans le tableau suivant :

Site	Test comparateur	Cible	Concordance générale	TP	TN	FP	FN	Sensibilité	Spécificité	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> avec seuil de coupure CT	1 (0,97-1)	29	100	0	0	1 (0,88-1)	1 (0,96-1)	1 (0,85-1)	1 (0,95-1)

Tableau 7. Les valeurs positives et négatives vraies (TP et TN), les valeurs positives et négatives fausses (FP et FN), la sensibilité, la spécificité, les valeurs positives prédictives et négatives (PPV et NPV) pour VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.

* Les échantillons discordants ont été testés à l'aide de la méthode moléculaire de référence RIDA®GENE Bacterial Stool panel (r-Biopharm). Les résultats indiquent qu'il y avait 1 faux positif pour *Cryptosporidium*. En utilisant un seuil de coupure de 37,5 ou 37 (uniquement dans le canal Cy5), toutes les valeurs faux positives disparaissent.

Les résultats montrent une grande concordance de détection de *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* avec le système VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® dans les échantillons fécaux.

12.2. Sensibilité analytique

Le VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® a une limite de détection de 40 copies par réaction pour *Cryptosporidium*, 25 copies par réaction pour *Giardia lamblia* et 0,6 cellules par réactions pour *E. histolytica*.

12.3. Spécificité analytique

La spécificité du test ciblant la présence du *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* et *E. histolytica*) été confirmée par l'analyse d'un panel composé de différents microorganismes représentant les pathogènes entériques ou la flore les plus courants présents dans l'intestin. Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre les microorganismes testés suivants :

Test de réactivité croisée					
<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>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	Coxsackievirus A24, A9 y B3	-		

Tableau 8. Microorganismes pathogènes de référence utilisés dans cette étude.

12.4. Réactivité analytique

La réactivité du VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® pour *Giardia lamblia* a été évaluée par rapport à l'ADN extrait d'une culture de *Giardia intestinalis* (synonyme : *Giardia lamblia, Giardia duodenalis*), présentant des résultats positifs.

La réactivité du VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® pour *Entamoeba histolytica* a été évaluée par rapport à l'ADN extrait d'une culture de *Entamoeba histolytica*, présentant des résultats positifs.

La réactivité du VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® pour *Cryptosporidium* a été évaluée par rapport à l'ADN extrait d'une culture de *Cryptosporidium parvum*, présentant des résultats positifs.

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> 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®.

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

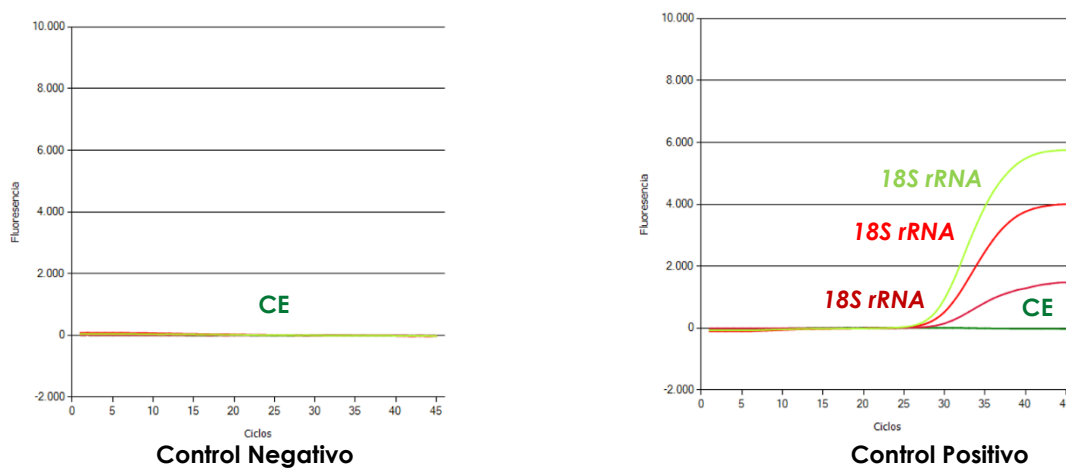
1 El Control de Extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación (Positivo o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. 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 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	-		

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.

Symboles pour les composants IVD et réactifs / Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i> Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Conserver dans un endroit sec Almacenar en lugar seco	 Utiliser Avant Fecha de caducidad	 Fabricant Fabricante	 Numéro de lot Número de lote
 Consulter les consignes d'utilisation Consultar las instrucciones de uso	 Limitation de température Limitación de temperatura	 Contenance suffisante pour <n> test(s) Contiene <n> test	 Identification unique du dispositif Identificación única de dispositivo	 Numéro de catalogue Número de referencia

Marques commerciales

Droits de modification réservés. Tous droits réservés. © CerTest Biotec, S.L.

Toutes les autres marques commerciales qui peuvent apparaître dans cette notice sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.

La technologie ELITe InGenius® est protégée par des brevets et des demandes de brevets.

Contrôle des modifications / Control de Cambios		
Version No. / Versión nº	Contrôle des modifications / Cambios	Date / Fecha
00	Version originale / Versión original	13/01/2022

Tableau A 2. Tableau de contrôle des modifications / Tabla de Control de Cambios.

Révision: 13th janvier 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

