

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica
for ELITe InGenius®

CE IVD



Le presenti istruzioni per l'uso si applicano al seguente prodotto / *Estas instrucciones de uso aplican para la siguiente referencia:*

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

Tabella A 1. Riferimenti del prodotto da utilizzare con ELITE InGenius®. / *Referencia del producto para ser usado con ELITE InGenius®.*

Sommario

1.	Usò previsto.....	5
2.	Introduzione e spiegazione	5
3.	Principi del procedimento.....	5
4.	Reagenti forniti	6
5.	Reagenti e strumenti necessari e non inclusi	6
6.	Condizioni di trasporto e conservazione	7
7.	Precauzioni per gli utenti.....	7
8.	Procedura di test.....	9
8.1.	Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni.....	9
8.2.	Preparazione del campione ed estrazione del DNA	9
8.3.	Controllo di estrazione	10
8.4.	Controllo positivo liofilizzato	10
8.5.	Provetta della miscela di reazione liofilizzata.....	10
8.6.	Condizioni PCR	11
8.6.1.	Programma del test PCR per VIASURE <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> & <i>E. histolytica</i> Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®	11
8.6.2.	Configurazione di ELITE InGenius® Instrument.....	12
9.	Interpretazione dei risultati	13
10.	Limiti del test	15
11.	Controllo di qualità	16
12.	Caratteristiche del test	17
12.1.	Sensibilità e specificità clinica	17
12.2.	Sensibilità analitica.....	17
12.3.	Specificità analitica	18
12.4.	Reattività analitica.....	19

Contenido

1.	Usò previsto.....	20
2.	Introducción y explicación	20
3.	Procedimiento	20
4.	Reactivos suministrados.....	21
5.	Material requerido y no suministrado	21
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento	22

7.	Precauciones para el usuario	22
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	31
12.1.	Sensibilidad y especificidad clínica	31
12.2.	Sensibilidad analítica	32
12.3.	Especificidad analítica	32
12.4.	Reactividad analítica	33
	Simboli per reagenti e componenti IVD/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	35
	Marchi commerciali.....	35

ITALIANO

1. Uso previsto

Il VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® è un test diagnostico automatizzato in vitro progettato per la rilevazione qualitativa di *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica* in campioni fecali umani da pazienti con segni e sintomi di infezione gastrointestinale. L'uso previsto di questo test è quello di facilitare la diagnosi di *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica* in combinazione con i fattori di rischio clinico ed epidemiologico. Il test è stato convalidato in associazione con ELITE InGenius®, un sistema integrato automatizzato per l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici. Il DNA viene estratto da campioni fecali, moltiplicato mediante amplificazione in tempo reale e rilevato utilizzando primer specifici e una sonda marcata con un colorante fluorescente per *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica*.

2. Introduzione e spiegazione

Le malattie da protozoi enterici continuano ad essere le più comunemente riscontrate, colpiscono milioni di persone ogni anno e causano una significativa morbilità e mortalità in tutto il mondo. Tra questi, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* sono i principali agenti eziologici.

Il *Cryptosporidium* può essere acquisito da persona a persona, dal contatto con animali da compagnia e da fattoria, dall'ingestione di cibo contaminato, dall'acqua potabile e dall'acqua ad uso ricreativo. Il *Cryptosporidium* può essere presente senza sintomi o causare diarrea e disagio addominale con perdita di peso e malassorbimento. L'infezione da *Giardia lamblia* avviene attraverso la trasmissione per via oro-fecale, per contatto diretto o per ingestione di cibo o acqua contaminati. La diarrea è il sintomo principale della malattia, ma le manifestazioni cliniche sono diverse: da infezioni non sintomatiche a diarrea grave, crampi addominali, gonfiore e flatulenza spesso accompagnati da nausea e perdita di peso. La malattia da *Entamoeba histolytica* si diffonde principalmente tramite cibo o acqua contaminati da cisti, ma può anche essere trasmessa da persona a persona per via oro-fecale. Le caratteristiche cliniche dell'amebiasi vanno dalla colonizzazione asintomatica (90% dei casi) alla dissenteria amebica (mal di stomaco, nausea o vomito e diarrea grave con feci sanguinolente e viscide, febbre) alla malattia extraintestinale invasiva, più comunemente sotto forma di ascessi epatici.

La microscopia è stata considerata il metodo standard di riferimento per la diagnosi di questi parassiti. Tuttavia, richiede molto tempo, non è molto sensibile e non è in grado di distinguere l'*E. histolytica* patogena invasiva dal parassita commensale *E. dispar*. Il test real-time PCR richiede meno lavoro e presenta una maggiore sensibilità e specificità, il che lo rende un'alternativa interessante.

3. Principi del procedimento

Il VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® è progettato per la rilevazione qualitativa del DNA di *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica* in campioni fecali. Dopo l'isolamento del DNA, l'identificazione dei patogeni viene eseguita tramite l'amplificazione di una regione conservata del gene 18S rRNA per *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* rispettivamente, utilizzando primer specifici e una sonda marcata a fluorescenza.

Il VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit si basa sull'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un aumento del segnale fluorescente proporzionale alla quantità del DNA bersaglio. La fluorescenza viene misurata su ELITE InGenius®.

Il VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® contiene in ciascun pozzetto tutti i componenti necessari per un test real-time PCR (sonde/primer specifici, dNTPS, tampone e polimerasi) in formato stabilizzato, e un controllo di estrazione per monitorare l'inibizione della PCR. I DNA target di *Cryptosporidium* sono amplificati e rilevati nel canale Cy5, i DNA target di *Giardia lamblia* sono amplificati e rilevati nel canale FAM, i DNA target di *Entamoeba histolytica* sono amplificati e rilevati nel canale ROX, e il controllo di estrazione (CE) nel canale HEX, VIC o JOE.

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

Tabella 1. Target, canale e geni.

4. Reagenti forniti

Il VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® include i materiali e i reagenti indicati nella Tabella 2:

Reagente/Materiale	Descrizione	Colore	Quantità
<i>Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica</i> Reaction-Mix tube	Una miscela di enzimi, sonde primer, tampone, dNTP e stabilizzatori in un formato stabilizzato	Bianco	4 fiale
Rehydration buffer	Soluzione per ricostituire il prodotto stabilizzato	Blu	1 fiala x 1,8 ml
Extraction Control	Acido nucleico non infettivo liofilizzato	Verde	1 fiala
<i>Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica</i> Positive Control	DNA sintetico liofilizzato non infettivo	Rosso	1 fiala
Negative Control	Controllo senza modello	Viola	1 fiala x 1 ml
Water RNase/DNase free	Acqua priva di RNasi/DNasi	Bianco	2 fiale x 1 ml

Tabella 2. Reagenti e materiali forniti con VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® di cat. N° VS-2340KGE196TE.

5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Il seguente elenco include i materiali richiesti per l'uso e che non sono inclusi nel VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.

- Soluzione automatizzata sample-to-result dedicata alla diagnostica molecolare: ELITE InGenius® Instrument (ELITechGroup S.p.A., cod. INT030).
- Cartucce di estrazione «ELITE InGenius® SP 200» (ELITechGroup S.p.A., cod. INT032SP200).
- Materiali di consumo per estrazione e amplificazione «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set» (ELITechGroup S.p.A, cod. INT032CS).
- Cartucce di amplificazione «ELITE InGenius® PCR Cassette» (ELITechGroup S.p.A, cod. INT035PCR).
- Punte «300 µL Filter Tips Axygen» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, cod. TF-350-L-R-S).
- Contenitori «ELITE InGenius® Waste Box» (ELITechGroup S.p.A, cod. F2102-000).
- Provetta Sarstedt da 2,0 ml con tappo a vite (cod. Sarstedt 72.694.005).
- Provetta Sarstedt da 0,5 ml con tappo a vite (cod. Sarstedt 72.730.005).
- Provetta conica da 50 ml
- Sistema di raccolta e trasporto dei campioni.
- Congelatori da laboratorio: da -30 °C a -10 °C e/o ≤ -70 °C.
- Microcentrifuga.
- Vortex.
- Micropipette (0,5-20 µl, 20-200 µl).
- Punte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.
- Cappa a flusso laminare.

6. Condizioni di trasporto e conservazione

- I kit possono essere spediti e conservati a 2-40 °C.
- Conservare il kit a 2-40 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, tranne la provetta della miscela di reazione reidratata. Una volta ricostituita, la *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix tube può essere conservata a 25 °C±5 °C o da 2 °C a 8 °C per un massimo di 4 ore. Per un periodo più lungo, si consiglia di conservare a -20 °C e di separare in aliquote per ridurre al minimo i cicli di congelamento e scongelamento (fino a 6 volte).
- La miscela di reazione reidratata deve essere richiusa e conservata all'interno della confezione con materiale essiccante per proteggerla dalla luce e dall'umidità.
- Una volta che il controllo positivo è stato risospeso, conservarlo a -20 °C. Si consiglia di separarlo in aliquote per ridurre al minimo i cicli di congelamento e scongelamento. Il controllo positivo è stato convalidato come ancora stabile dopo 6 cicli di congelamento e scongelamento.
- Tenere i componenti lontano dalla luce del sole.

7. Precauzioni per gli utenti

- Il prodotto è destinato all'uso da parte di personale di laboratorio clinico qualificato e addestrato in modo specifico nelle tecniche di real-time PCR, genetica umana e procedure diagnostiche *in vitro* (inclusa la formazione su ELITE InGenius®).
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.

- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione una volta aperta.
- Chiudere la confezione protettiva dei reagenti con la cerniera subito dopo ogni utilizzo. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di chiuderle.
- Non utilizzare reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti e/o altri fornitori.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo alla provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.
- Progettare un flusso di lavoro unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente. Utilizzare aree separate per la preparazione dei campioni dei pazienti e dei controlli per evitare risultati falsi positivi.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®, la cartuccia di estrazione ELITE InGenius® SP 200, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test ed ELITE InGenius® non siano contaminati. Evitare sempre la contaminazione dei reagenti con microbi e ribonucleasi (RNasi)/desossiribonucleasi (DNasi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNasi/DNasi. Usare un nuovo puntale per ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce.
- Assicurarsi che la cartuccia di estrazione ELITE InGenius® SP 200 e la ELITE InGenius® PCR Cassette siano assemblate correttamente (consultare le istruzioni per l'uso di ELITE InGenius® cod. INT030).
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non rimuovere il tappo della ELITE InGenius® PCR Cassette dopo l'uso. I tappi della ELITE InGenius® PCR Cassette sono progettati per evitare la contaminazione.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare abiti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi e/o a rischio biologico, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni, e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, il trasporto, la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei campioni.
- I campioni e i reagenti devono essere manipolati in una cappa di biosicurezza. Usare personal protective equipment (PPE) compatibili con le linee guida correnti per la manipolazione dei campioni potenzialmente infettivi. Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali e nazionali.
- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- In conformità con il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kit non richiede una scheda dati sulla sicurezza (Safety Data Sheet) dei materiali a causa della sua classificazione come non pericoloso per la salute e per l'ambiente, perché non contiene sostanze e/o miscele che soddisfano i criteri di

classificazione dei rischi riportati nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) o presenti a concentrazioni superiori al valore definito nel regolamento sopra menzionato in base alla relativa dichiarazione.

- Consultare il manuale di riferimento di ogni strumento per real-time PCR per ulteriori avvertenze, precauzioni e procedure.
- Prima di utilizzare il VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®, consultare il manuale utente di ELITE InGenius® e la "ELITE InGenius® Quick Reference Guide" per ulteriori avvertenze, precauzioni e procedure.
- Assicurarsi che il software di ELITE InGenius® System sia l'ultima versione aggiornata.

8. Procedura di test

8.1. Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni

Il VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® è stato convalidato su campioni fecali. Altre tipologie di campioni devono essere convalidate dall'utente.

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utente. In generale, i campioni fecali dovrebbero essere raccolti ed etichettati in modo appropriato in contenitori puliti. Dopo la raccolta, i campioni devono essere messi in un sacchetto per materiale a rischio biologico e devono essere trasportati e processati il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati a temperatura ambiente entro le prime 2 ore, o tra i 2 e gli 8 °C entro le prime 24 ore, nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata (oltre 24 ore), raccomandiamo una spedizione a -20 °C o a temperatura inferiore. Per effettuare il test, è consigliato l'utilizzo di campioni appena raccolti. I campioni possono essere conservati da 2 a 8 °C fino a un massimo di 24 ore oppure congelati a -20 °C o idealmente a -70 °C. Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per evitare il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

I campioni clinici devono essere prelevati, trasportati e conservati in conformità alle linee guida di laboratorio appropriate. Per i dettagli, consultare le linee guida CDC (linee guida per la raccolta dei campioni). Sito web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>, e linee guida IDSA (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. Preparazione del campione ed estrazione del DNA

I campioni fecali devono essere raccolti in contenitori puliti e processati il prima possibile per garantire la qualità del test. Si raccomanda di utilizzare campioni freschi.

Per una conservazione più lunga, i campioni devono essere congelati tra -20 °C e -70 °C. In questo caso, il campione sarà completamente scongelato e portato a temperatura ambiente prima dell'analisi. Omogeneizzare

il campione fecale il più accuratamente possibile prima della preparazione. I cicli di congelamento e scongelamento non sono raccomandati.

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni per l'uso del kit di estrazione, ELITE InGenius® e la "ELITE InGenius® Quick Reference Guide". Si prega di notare che altri tipi di campioni possono richiedere un pretrattamento. Per i campioni fecali, utilizzare il protocollo "Campione di feci: pretrattamento per il target batterico e parassitario con ELITE InGenius®". Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utente.

8.3. Controllo di estrazione

Ricostituire il controllo di estrazione (fiala verde) aggiungendo 500 µl di acqua priva di RNasi/DNasi (fiala bianca) e miscelare con vortex accuratamente. Trasferire il controllo di estrazione reidratato nella provetta da 0,5 ml con tappo a vite (cod. 72.730.005).

8.4. Controllo positivo liofilizzato

Il *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control contiene alte copie del modello; si raccomanda di aprirlo e manipolarlo in un'area del laboratorio separata, lontano dagli altri componenti. Ricostituire il *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control (fiala rossa) aggiungendo 950 µl dell'acqua priva di RNasi/DNasi in dotazione (fiala bianca) e miscelare con vortex accuratamente.

Una volta che il controllo positivo è stato risospeso, conservarlo a -20 °C. Si raccomanda di separarlo in aliquote per ridurre al minimo i cicli di congelamento e scongelamento

8.5. Provetta della miscela di reazione liofilizzata

Stabilire il numero di reazioni necessarie, compresi i campioni e i controlli (per ogni ciclo devono essere inclusi un controllo positivo e uno negativo). Preparare il numero corretto di provette della miscela di reazione liofilizzata (24 reazioni ciascuno) per il test.

Si raccomanda di aprire e manipolare la *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix tube nell'area del laboratorio pre-PCR. Aprire la provetta della miscela di reazione liofilizzata (fiala bianca) con cautela per evitare la rottura del pellet e aggiungere 390 µl del Rehydration buffer (fiala blu) in dotazione. Mescolare delicatamente tramite pipettaggio verso l'alto e verso il basso. Ruotare brevemente per rimuovere le bolle generate durante la miscelazione.

Una volta che la provetta della miscela di reazione è stata risospesa, riportare i reagenti inutilizzati nelle condizioni di conservazione appropriate a -20 °C. Si raccomanda di separarlo in aliquote per ridurre al minimo i cicli di congelamento e scongelamento.

Nota: il volume della miscela di reazione reidratata è sufficiente per 24 reazioni. La miscela di reazione reidratata può essere conservata a 25 °C±5 °C o a 2-8 °C per un massimo di 4 ore (per ulteriori opzioni di conservazione, consultare la sezione Condizioni di trasporto e conservazione).

8.6. Condizioni PCR

Nota: consultare il manuale utente di ELITE InGenius® e la "ELITE InGenius® Quick Reference Guide" per istruzioni dettagliate.

8.6.1. Programma del test PCR per VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®

Il prodotto VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® può essere utilizzato con ELITE InGenius® System per eseguire:

- A. Ciclo integrato (estrazione + PCR)
- B. Ciclo di amplificazione (solo PCR)
- C. Ciclo di estrazione (solo estrazione)

Per impostare un ciclo integrato (A), eseguire i seguenti passaggi in base all'interfaccia grafica utente (GUI).

- 1) Accendere lo strumento ed accedere con le proprie credenziali.
- 2) Selezionare "Perform Run" (Esegui operazione) dalla schermata "Home".

Nota: verificare che i controlli di amplificazione (controllo positivo e controllo negativo) siano stati eseguiti e non siano scaduti (stato) insieme al lotto di reagente di amplificazione da utilizzare. Se non si dispone di controlli di amplificazione validi e approvati, questi devono essere eseguiti come indicato nelle seguenti sezioni.

- 3) Verificare che il "Volume in entrata dell'estrazione" sia pari a 200 µl e che il "Volume di eluito estratto" sia pari a 100 µl.
- 4) Per ogni "supporto", scansionare o digitare i codici a barre del campione.
- 5) Selezionare il protocollo del test nella colonna "Assay" (Test): VIASURE_KGE_00. Assicurarsi che il protocollo selezionato sia "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).
- 6) Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) e poi selezionare "Extraction tube" (Provetta di estrazione).
- 7) Caricare e verificare tutti i materiali di consumo e i reagenti necessari.
 - Caricare il controllo di estrazione e la *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction-Mix tube nel "Blocco inventario" selezionato seguendo le istruzioni sull'interfaccia.
 - Caricare e controllare le griglie per puntali nell'"Area inventario" selezionata seguendo le istruzioni sulla GUI.
 - Caricare le "PCR Cassette", le cartucce di estrazione "ELITE InGenius® SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre seguendo le istruzioni sulla GUI
- 8) Chiudere la porta e iniziare l'operazione.
- 9) Osservare e approvare i risultati.

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nel protocollo del test disponibile sullo strumento e vengono richiamati automaticamente quando si seleziona il protocollo del test.

Di seguito è riportata una sintesi delle impostazioni del programma:

- I. Nome del protocollo del test: VIASURE_KGE_00
- II. Estrazione
 - a. Nome cartuccia di estrazione: ELITE InGenius® SP 200.
 - b. Volume in entrata dell'estrazione: 200 µl
 - c. Volume di eluizione dell'estrazione: 100 µl
- III. PCR
 - a. Volume della reazione totale: 20 µl
 - b. Volume modello PCR: 5 µl
 - c. Condizioni del protocollo PCR:

Cicli	Fase	Tempo (s)	Temperatura
1	Denaturazione iniziale	120	95 °C
45	Denaturazione	10	95 °C
	Allineamento/Estensione (Raccolta dati*)	50	60 °C

Tabella 3. Protocollo PCR.

- d. Leggere la fluorescenza nella fase di "Allineamento/Estensione (Raccolta dati*)". I dati fluorogenici devono essere raccolti durante la fase di estensione (*) attraverso i canali *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, *E. histolytica* e del controllo di estrazione.

La modalità di sola PCR (B) prevede tutti i passi indicati in precedenza considerando le seguenti variazioni:

- Fase 3: Anche se non verrà eseguita alcuna estrazione, assicurarsi che il "Volume in entrata dell'estrazione" sia pari a 200 µl e che il "Volume di eluito estratto" sia pari a 100 µl.
- Fase 6: Selezionare "PCR only" (Solo PCR) e impostare la posizione del campione come "Elution tube" (Provetta di eluizione) (fila inferiore).

La modalità di sola estrazione (C) prevede tutti i passi indicati in precedenza considerando le seguenti variazioni:

- Fase 3: Assicurarsi che il "Volume in entrata dell'estrazione" sia pari a 200 µl e che il "Volume di eluito estratto" sia pari a 100 µl.
- Fase 6: Selezionare "Extraction only" (Solo estrazione) e "Primary o Extraction tube" (Provetta primaria o di estrazione).

8.6.2. Configurazione di ELITE InGenius® Instrument

Per le istruzioni su come configurare ELITE InGenius® System, tra cui l'impostazione dello strumento, l'esecuzione di un test, il caricamento della griglia di cartucce e della griglia di campioni su ELITE InGenius®, la revisione e l'approvazione dei risultati, la generazione dei risultati, la conclusione del ciclo, la manutenzione e lo spegnimento dello strumento, fare riferimento al manuale utente di ELITE InGenius® e alla "ELITE InGenius® Quick Reference Guide".

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare e approvare i dati, fare riferimento al manuale utente di ELITE InGenius.

Tutti i risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici. Controllare l'emissione del segnale del controllo di estrazione (CE) per verificare la procedura di estrazione e/o il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. L'analisi dei controlli e dei campioni viene eseguita dal software dell'apparecchiatura di real-time PCR utilizzata in base alle istruzioni del produttore. Utilizzando le seguenti tabelle 4 e 5, leggere e analizzare i risultati.

L'uso di controlli positivi e negativi in ciascun ciclo convalida la reazione controllando l'assenza di segnale nella provetta del controllo negativo e la presenza di segnale per *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* & *E. histolytica* nella provetta del controllo positivo. Per un ciclo di test diagnostico valido, devono essere soddisfatte le seguenti condizioni di controllo:

Controlli	<i>Cryptosporidium</i> ¹	<i>Giardia lamblia</i> ¹	<i>E. histolytica</i> ¹	Controllo di estrazione	Interpretazione dei controlli
Controllo positivo (CP)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo ²	Superato
Controllo negativo (CN)	Negativo o nessun segnale	Negativo o nessun segnale	Negativo o nessun segnale	n.p.	Superato

Tabella 4. Prestazioni previste dei controlli. Nessun segnale = nessuna curva di amplificazione

1 Nei casi di insuccesso di uno o entrambi i test di controllo (si osserva un segnale di amplificazione nel controllo negativo e/o l'assenza di segnali nella provetta di controllo positivo per qualsiasi canale target), tutti i risultati sono riportati come "non riusciti" ed è necessario ripetere il test.

2 Il controllo di estrazione (CE) dovrebbe mostrare un segnale di amplificazione (valore positivo nel pozzetto del controllo positivo (CP)). È possibile osservare differenze nei valori di Ct nel controllo di estrazione tra il controllo positivo e i campioni clinici, a causa del processo di estrazione.

La valutazione dei risultati dei test su campioni clinici deve essere eseguita dopo la convalida e l'approvazione dei controlli positivi e negativi. Verificare che il controllo positivo e il controllo negativo di amplificazione siano stati eseguiti con il lotto di reagente di amplificazione da utilizzare. Entrambi i risultati dei controlli scadono dopo 15 giorni.

Qualora uno o più controlli non fossero validi, i risultati del paziente non potranno essere interpretati.

Per l'interpretazione dei risultati dei campioni di singoli pazienti, utilizzare i seguenti criteri di lettura e analisi dei risultati:

<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	Controllo di estrazione	Interpretazione dei campioni di singoli pazienti	
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo o nessun segnale ¹	Superato	Positivo per <i>Cryptosporidium</i>, <i>Giardia lamblia</i> e <i>E. histolytica</i>
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Superato	Negativo per <i>Cryptosporidium</i>, <i>Giardia lamblia</i> e <i>E. histolytica</i>
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo o nessun segnale ¹	Superato	Positivo per <i>Cryptosporidium</i>, negativo per <i>Giardia lamblia</i> e <i>E. histolytica</i>
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo o nessun segnale ¹	Superato	Positivo per <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia lamblia</i>, negativo per <i>E. histolytica</i>
Positivo	Negativo	Positivo	Positivo o nessun segnale ¹	Superato	Positivo per <i>Cryptosporidium</i> e <i>E. histolytica</i>, negativo per <i>Giardia lamblia</i>
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo o nessun segnale ¹	Superato	Positivo per <i>Giardia lamblia</i>, negativo per <i>Cryptosporidium</i> e <i>E. histolytica</i>
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo o nessun segnale ¹	Superato	Positivo per <i>Giardia lamblia</i> e <i>E. histolytica</i>, negativo per <i>Cryptosporidium</i>
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo o nessun segnale ¹	Superato	Positivo per <i>E. histolytica</i> Positive, negativo per <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia lamblia</i>
Negativo nessun segnale	Negativo o nessun segnale	Negativo o nessun segnale	Negativo o nessun segnale ²	Non riuscito	Test non riuscito - Ripetere il test² Segnalato come "Invalid" (Non valido) nell'interfaccia grafica utente (GUI) del sistema ELITe InGenius® System.

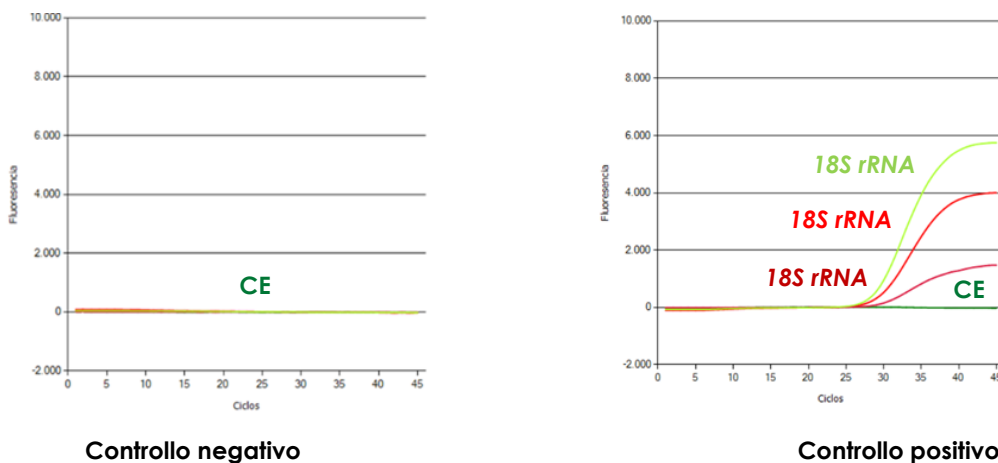
Tabella 5. Interpretazione dei risultati dei campioni dei pazienti. Valori di Ct. Nessun segnale = nessuna curva di amplificazione.

¹ Il controllo di estrazione (CE) mostra o meno un segnale di amplificazione (positivo o nessun segnale). A volte il rilevamento non è necessario perché la presenza di un elevato numero del target può provocare l'amplificazione preferenziale di acidi nucleici target-specifici. È possibile osservare differenze nei valori di Ct nel controllo di estrazione tra i controlli e i campioni clinici, a causa del processo di estrazione.

2 Nel caso in cui sia negativo ai geni target di *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e *E. histolytica*, il CE deve mostrare un segnale di amplificazione. Qualora il segnale fosse assente o vi fosse un valore Ct negativo del controllo di estrazione, il risultato viene considerato come "non valido" ed è necessario ripetere il test. Si raccomanda di ripetere la RT-qPCR diluendo il campione di RNA 1:10 e/o 1:100, o di estrarre nuovamente e ripetere il test per verificare eventuali errori nella procedura di estrazione e/o problemi di inibizione.

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere il manuale utente di ELITE InGenius® e la "ELITE InGenius® Quick Reference Guide" per verificare la corretta esecuzione del processo di estrazione e di ciascun passaggio del test RT-qPCR, per rivedere i parametri e per verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza.

Figura 1. Esecuzione corretta del ciclo di controllo negativo e positivo su ELITE InGenius®.



10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- Nonostante questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato convalidato solo con DNA estratto da campioni fecali umani.
- Le caratteristiche di valutazione delle prestazioni sono state valutate seguendo il protocollo PCR denominato: VIASURE_KGE_00. Nel caso di utilizzo di un protocollo diverso da quello indicato, il test deve essere validato da l'utente finale.
- Per prestazioni del test ottimali, il prodotto liofilizzato deve trovarsi in fondo alla provetta e non deve aderire alla parte superiore della provetta o del sigillo di alluminio. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo alla provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.
- La qualità del test dipende dalla qualità del campione: gli acidi nucleici devono essere estratti in modo appropriato da campioni fecali.
- Questo test è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti.
- Possono essere rilevati livelli estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento, ma i risultati non possono essere riproducibili.

- Esiste la possibilità di risultati falsi positivi a causa della contaminazione crociata di *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica*, sia per l'alto numero di copie di DNA modello che contiene ogni fiala di *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control, sia per campioni contenenti alte concentrazioni di DNA target o contaminazione dovuta a prodotti per PCR di reazioni precedenti.
- Esiste la possibilità di risultati falsi positivi a causa della contaminazione crociata tra il controllo di estrazione e il *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Positive Control, che contiene un alto numero di copie del modello, durante la rispettiva ricostituzione con l'aggiunta di acqua priva di RNasi/DNasi (fiala bianca). Tutte le procedure devono avvenire seguendo un ordine stabilito e in un'area del laboratorio separata.
- I risultati falsi negativi possono essere dovuti a diversi fattori e a combinazioni di essi; questi includono:
 - Metodi di prelievo, trasporto, conservazione e/o manipolazione dei campioni incorretti.
 - Procedure di preparazione incorrette (inclusa l'estrazione di DNA).
 - Degradazione del DNA durante l'invio/la conservazione e/o la preparazione dei campioni.
 - Carica virale del campione al di sotto del limite di rilevamento del test.
 - Presenza di inibitori della RT-qPCR o di altri tipi di sostanze interferenti. Non è stato valutato l'impatto degli antibiotici utilizzati per prevenire *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica* o utilizzati durante il trattamento dell'infezione.
 - Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura per il test.

In caso di dubbio, fare riferimento alla sezione 9 per verificare la corretta interpretazione dei risultati.

- Un segnale CE negativo non esclude la presenza del DNA di *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica* in un campione clinico.
- Il risultato positivo di un test non indica necessariamente la presenza del patogeno vivo e non implica che tale patogeno sia infettivo o che sia l'agente eziologico dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza di sequenze batteriche target (*gene 18S rRNA*).
- I risultati negativi non escludono un'infezione da *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica* e non devono essere usati come unica base per il trattamento o per altre decisioni riguardanti la gestione del paziente. Non sono stati definiti i tipi di campioni ottimali e il periodo ottimale dei livelli virali picco durante le infezioni causate da *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica*. Per rilevare il patogeno può essere necessario prelevare più campioni (tipi e periodo di campionamento) dallo stesso paziente.
- Se i test diagnostici per altre malattie gastrointestinali sono negativi e la presentazione clinica e le informazioni epidemiologiche del paziente indicano la possibilità di un'infezione da *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica*, è necessario prendere in considerazione un risultato falso negativo e valutare la ripetizione del test.
- I valori di fluorescenza possono variare a causa di molteplici fattori, tra i quali: apparecchiatura PCR, sistema di estrazione, tipo di campione, trattamento precedente del campione, ecc...

11. Controllo di qualità

Il VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® contiene un controllo positivo e un controllo negativo che devono essere inclusi in ciascun ciclo per interpretare correttamente i risultati. Inoltre, il controllo di estrazione (CE) di ciascuna provetta di campione conferma la corretta esecuzione della tecnica.

12. Caratteristiche del test

12.1. Sensibilità e specificità clinica

La prestazione clinica del VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® è stata testata utilizzando campioni clinici di feci da pazienti con sospetta infezione gastrointestinale.

Al fine di determinare l'accuratezza diagnostica clinica, sono state condotte diverse valutazioni in collaborazione con enti nazionali. La seguente tabella contiene una sintesi dei siti, del tipo di campione e del flusso di lavoro. I risultati sono stati i seguenti:

	Sito	Tipo di campione	Flusso di lavoro	Target
1	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Saragozza, Spagna)	Tamponi per feci	ELITE InGenius® SP 200 + ELITE InGenius® System	<i>Cryptosporidium</i>
				<i>Giardia</i>
				<i>E. histolytica</i>

Tabella 6. Sito, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

I valori positivi e negativi reali, i valori falsi positivi e falsi negativi, la sensibilità, la specificità e i valori VPP e VPN di VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® sono stati calcolati in relazione a ciascun test di confronto, come riportato nella seguente tabella:

Sito	Test di confronto	Target	Accordo complessivo	TP	TN	FP	FN	Sensibilità	Specificità	VPP	VPN
1	Colorazione Ziehl-Neelsen e visualizzazione al microscopio + 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> con $CT_{cut-off}$	1 (0,97-1)	29	100	0	0	1 (0,88-1)	1 (0,96-1)	1 (0,85-1)	1 (0,95-1)

Tabella 7. Valori positivi (TP) e negativi (TN) reali, valori falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN), sensibilità, specificità, Valori predittivi positivi (VPP), Valori predittivi negativi (VPN) per il VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius®.

* I campioni discrepanti sono stati testati utilizzando il metodo molecolare di riferimento RIDA®GENE Bacterial Stool panel (r-Biopharm). I risultati indicano la presenza di 1 falso positivo per *Cryptosporidium*. Usando una soglia di 37,5 o 37 (solo nel canale Cy5), tutti i valori falsi positivi scompaiono.

I risultati mostrano un'elevata concordanza nel rilevamento di *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e *E. histolytica* con l'utilizzo di VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® in campioni di feci.

12.2. Sensibilità analitica

Il VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® presenta un limite di rilevamento di 40 copie per reazione per *Cryptosporidium*, 25 copie per reazione per *Giardia lamblia* e 0,6 cellule per reazione per *E. histolytica*.

12.3. Specificità analitica

La specificità del test per *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* e *E. histolytica* è stata confermata testando un pannello formato da diversi microorganismi che rappresentano i patogeni enterici più comuni o la flora presente nell'intestino. Non è stata rilevata alcuna reattività crociata tra i seguenti microorganismi testati.

Test di reattività crociata					
<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	-		

Tabella 8. Microorganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.

12.4. Reattività analitica

La reattività di VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® per *Giardia lamblia* è stata valutata sulla base del DNA estratto da coltura di *Giardia intestinalis* (sinonimo: *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*), mostrando risultati positivi.

La reattività di VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® per *Entamoeba histolytica* è stata valutata sulla base del DNA estratto di *Entamoeba histolytica*, mostrando risultati positivi.

La reattività di VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for ELITE InGenius® per *Cryptosporidium* è stata valutata sulla base del DNA estratto da *Cryptosporidium parvum*, mostrando risultati positivi.

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 $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ o $2-8^{\circ}\text{C}$ 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.

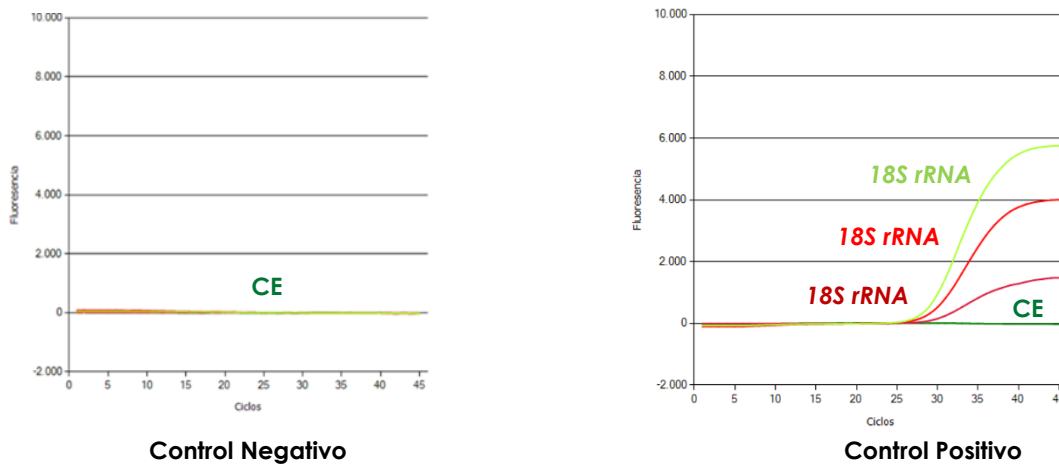
1 El Control de Extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación (Positivo o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. 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 +	<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)
	RIDA@GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm)	<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.

Simboli per reagenti e componenti IVD/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i> Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Mantener asciutto Almacenar en lugar seco	 Usare entro Fecha de caducidad	 Produttore Fabricante	 Codice del lotto Número de lote
 Consultare le istruzioni per l'uso Consultar las instrucciones de uso	 Limitazione temperatura Limitación de temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test Contiene <n> test	 Identificazion e unica del dispositivo Identificación única de dispositivo	 Numero di catalogo Número de referencia

Marchi commerciali

Diritti di modifica riservati. Tutti i diritti riservati. © CerTest Biotec, S.L.

Tutti gli altri marchi che possono apparire in questo foglietto illustrativo sono di proprietà dei rispettivi proprietari.

La tecnologia ELITE InGenius® è coperta da brevetti e richieste di brevetti.

Controllo modifiche / Control de Cambios		
N. versione / Versión n°	Modifiche / Cambios	Data / Fecha
00	Versione originale / Versión original	13/01/2022

Tabella A 2. Tabella di controllo modifiche./ Tabla de Control de Cambios.

Revisione: 13 gennaio 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

