

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Gastrointestinal Panel I

CE

IVD



These instructions for use apply to the following references / Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GP0112L
VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GP0112H

Table A 1. References for Open format with internal control products. / Referencias para productos Open Format con control interno.

OPEN FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 2) / OPEN FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GP0112LE
VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GP0112HE

Table A 2. References for Open format with extraction control products. / Referencias para productos Open Format con control de extracción.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Las instrucciones de uso (IFU) se incluyen en el kit en versión inglés/español.

EN For download IFUS from other languages, please enter in certest.es/viasure/labeling. Once you be there, please following the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

ES Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en certest.es/viasure/labeling. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

RO Pentru a descărca IFUS în alte limbi, vă rugăm să accesați certest.es/viasure/labeling. Accesat site-ul, urmați instrucțiunile pentru a selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur certest.es/viasure/labeling. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

DE Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu certest.es/viasure/labeling. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

IT Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su certest.es/viasure/labeling. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

PT Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse certest.es/viasure/labeling. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: viasure@certest.es.

NE Om de IFUS in andere talen te downloaden, gaat u naar certest.es/viasure/labeling. Als je daar bent, volg je de instructies om toegang te krijgen tot de taal die je nodig hebt. Neem voor meer informatie contact op met: viasure@certest.es.

Note: The user should notify the manufacturer and the competent authority of the Member State in which he is established as a user and/or patient of any serious incident related to the product.

Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	7
4.	Reagents provided	8
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	8
6.	Transport and storage conditions.....	8
7.	Precautions for users	9
8.	Test procedure	10
9.	Result interpretation	11
10.	Limitations of the test	18
11.	Quality control.....	19
12.	Performance characteristics.....	19
	ANNEX 1	23
A1.1	Principle of the procedure.....	23
A1.2	Reagents provided.....	24
A1.3	Test procedure.....	24
	ANNEX 2	26
A2.1	Principle of the procedure.....	26
A2.2	Reagents provided.....	27
A2.3	Test procedure	27

Contenido

1.	Uso previsto	29
2.	Introducción y explicación	29
3.	Procedimiento	31
4.	Reactivos suministrados.....	32
5.	Material requerido y no suministrado	32
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento	33
7.	Precauciones para el usuario	33
8.	Procedimiento del test	34
9.	Interpretación de resultados.....	35
10.	Limitaciones del test	43
11.	Control de calidad	44

12. Características del test 44

 ANEXO 1 48

 A1.1 Procedimiento 48

 A1.2 Reactivos suministrados 49

 A1.3 Procedimiento del test 49

 ANEXO 2..... 51

 A2.1 Procedimiento 51

 A2.2 Reactivos suministrados 52

 A2.3 Procedimiento del test 52

Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro* 56

Trademarks..... 56

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit is a real-time RT-PCR test designed for the specific and qualitative detection of DNA/RNA from *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Yersinia enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica*, Norovirus GI and/or Norovirus GII (NoV), Rotavirus (RV), Adenovirus (AdV), Astrovirus (AstV) and/or Sapovirus (SaV) in human faeces samples from patients with signs and symptoms of gastrointestinal infection by their healthcare professional (HCP). The test is intended for use as an aid in the diagnosis of *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* and/or *E. histolytica*, NoV GI and/or NoV GII, RV, AdV, AstV and/or SaV in combination with clinical and epidemiological risk factors.

DNA/RNA is extracted from clinical samples, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* and/or *E. histolytica*, NoV GI and/or NoV GII, RV, AdV, AstV and/or SaV.

2. Summary and Explanation

Viruses, bacteria and/or parasites can cause gastroenteritis, an inflammation of the gastrointestinal tract that affects both the stomach and the small intestine. Gastrointestinal infections are self-limited and resolved within a few days. However, in a healthcare setting and in specific populations (newborns/infants, immunocompromised patients, or older populations), are potentially serious. Therefore, rapid diagnosis, appropriate treatment, and infection control measures are particularly important in these settings.

The genus *Salmonella* is taxonomically divided into 6 subspecies of *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*. *Salmonella* causes two types of illnesses: enteric fever (typhoid) and acute gastroenteritis, commonly called salmonellosis. *Salmonella* transmission occurs through contaminated food (poultry, poultry products, beef, pork, eggs, milk, and shellfish), water, or through contact with infected animals. *Salmonella*-infected patients frequently experience nausea, vomiting, abdominal pain, muscle aches, fever, severe diarrhoea, and/or headaches.

The genus *Campylobacter* consists of 26 species, 2 provisional species, and 9 subspecies. The *Campylobacter* species most commonly associated with human diseases are *C. jejuni* and *C. coli*, but there are other species than can also cause human infections. Poultry is the largest source of transmission of *Campylobacter* to humans. Other risk factors include consumption of animal products and water, contact with animals, and even person-to-person transmission (faecal-oral route through vomiting). *Campylobacter* infection causes gastroenteritis characterised by fever, vomiting, headaches, head and abdominal pain with watery or bloody diarrhoea, averaging 6 days.

The genus *Yersinia* includes three pathogenic species in humans and animals: *Yersinia enterocolitica*, *pestis* and *pseudotuberculosis*. There are six biotypes of *Y. enterocolitica*; five of which are considered human pathogens (biotypes 1B, 2, 3, 4 and 5). In addition, there are 60 to 70 serotypes, among which O:3, O:9, O:8, O:5. 27 are associated with disease in humans. *Yersinia enterocolitica* is a foodborne pathogen and its clinical manifestation often include nausea, vomiting, abdominal pain, diarrhoea, and fever. There are clear indications that animal foods, especially pork and dairy products, are responsible for human infections.

Shigellosis is a type of bacillary dysentery characterised by severe diarrhoea that contains blood and mucus. The disease is caused by any of the four *Shigella* species (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* and *S. sonnei*), by enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). In fact, the differentiation of *Shigella* and *E. coli* enteroinvasive is complicated due to the ability to cause dysentery using the same invasive method. Shigellosis is a frequently foodborne illness, especially in foods that require processing and / or are prepared from raw or previously cooked products without reheat. The low infective dose (10 cells) allows the disease to spread effectively through infected food or water, and through human-to-person contact.

Cryptosporidium can be transmitted by several routes: person-to-person contact and with companion and / or farm animals, as well as ingestion of contaminated food, drinking water and water for recreational use. *Cryptosporidium* can be present asymptotically or cause diarrhea and abdominal discomfort with weight loss and malabsorption. *Giardia lamblia* infection occurs by fecal-oral transmission, through direct contact or by ingestion of contaminated food or water. Diarrhea is the main symptom of this disease, but the clinical manifestations vary, from asymptomatic infections to acute diarrhea, abdominal cramps, bloating and flatulence often accompanied by nausea and weight loss. *Entamoeba histolytica* disease is spread mainly by water or food contaminated with cysts but can also be transmitted from person to person through the fecal-oral route. The clinical features of amoebiasis range from asymptomatic colonization (90% of cases) to amoebic dysentery (stomach pain, nausea or vomiting, and severe hemorrhagic diarrhea and fever) or illness invasive extraintestinal, most commonly in the form of liver abscesses.

Norovirus (NoV) belongs to the *Caliciviridae* family and is considered the leading cause of acute non-bacterial gastroenteritis in all age groups worldwide. NoVs are classified into six distinct genogroups (GI-GVI) based on the phylogenetic tree inferred by comparison of the complete peptide sequence of VP1. In particular, the GI, GII, and GIV genogroups infect humans. After an incubation period of 12 to 48 hours, Norovirus disease is characterised by projectile vomiting, non-bloody diarrhoea, nausea, abdominal cramps, and low-grade fever. Noroviruses can infect humans through multiple routes, including the oral route, transmitted through contact with fecal matter or by aerosolization of the vomit of infected people, as well as contaminated surfaces, food, or water.

Rotavirus (RV) infection is the world's leading cause of severe gastroenteritis in infants and children under 5 years of age. The genus *Rotavirus* belongs to the *Reoviridae* family. Rotaviruses can be divided into 7 distinct groups (A-G). Rotavirus A-C serogroups are human pathogens, although Rotavirus A produces more than 90% of infections. The main route of transmission is fecal-oral due to contamination of food, water, or objects. Characteristic symptoms are vomiting, watery diarrhoea, and abdominal pain.

Adenoviruses belong to the *Adenoviridae* family of unencapsulated double-stranded DNA (dsDNA) viruses. There are more than 50 immunologically differentiated serotypes of human Adenoviruses grouped into 6 species (HADV-A to HADV-F) that can cause infections in humans ranging from respiratory diseases (mainly HADV-B and C), and conjunctivitis (HADV-B. and D), up to gastroenteritis (AdVH-F serotypes 40 and 41). In addition to the latter, AdVH serotypes 31, 12, 18, 1, 2, 5 and 6 have also been associated with acute diarrhea. Although the epidemiological characteristics of Adenovirus vary by type, all are transmitted by direct contact or by the fecal-oral route and are considered pathogens for all age groups of the disease. population regardless of age, especially for children. In fact, these viruses are highly infectious, and a few viral particles are enough to cause infection.

Human Astroviruses (HAstVs) belong to the *Astroviridae* family. The 8 classic HAstVs serotypes represent 2-9% of all acute non-bacterial gastroenteritis in children worldwide, although infections have also been reported in healthy adults, the elderly, and immunocompromised patients. Typically, HAstV infection induces mild, watery diarrhea that lasts 2 to 3 days, along with vomiting, fever, anorexia, and abdominal pain. The infection is transmitted primarily through the fecal-oral route, even though food and water can act as vehicles for the transmission of human enteric viruses.

Sapoviruses (SaV), formerly known as "Sapporo-like viruses," belong to the *Caliciviridae* family and cause acute gastroenteritis in humans and pigs. Fifteen genotypes grouped into four genogroups (GI.1 to GI.8, GII.1 to GII.5, GIV, and GV) have been described as causing infection in humans. SaV is considered an important cause of gastroenteritis in children under 5 years of age, while in adults it is less important. The clinical symptoms of sapovirus infection are believed to be milder than symptoms associated with norovirus, including mild or acute watery diarrhea, stomach cramps, nausea, vomiting, and occasionally fever. SaVs can be transmitted through the fecal-oral route from contaminated food and water, as well as through person-to-person contact.

Culture, antigen detection, and microscopy have been considered the gold standard methods for the diagnosis of these pathogens; however, it is time consuming and not very sensitive. The real-time PCR assay is less labor-intensive and has higher sensitivity and specificity, making it an attractive alternative.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of RNA/DNA *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* and/or *E. histolytica*, NoV GI and/or NoV GII, RV, AdV, AstV and/or SaV in faeces samples. After DNA isolation, the identification of AdV, *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* and/or *E. histolytica* is performed by the amplification of a conserved region of the specific genes using specific primers and fluorescent-labelled probes. After RNA isolation, the detection of RNA viruses NoV GI, NoV GII, RV, AtV and SaV is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of specific genes using specific primers and a fluorescent-labelled probes.

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition (if present).

4. Reagents provided

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open format with internal control products and Annex 2 for open format with extraction control products.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates).
- DNA/RNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 μL , 20-200 μL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics), Rotor-Gene® Q (Qiagen), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), DTlite Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology). To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with VIASURE Real Time PCR Detection Kits. This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.

- Keep components away from light.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and in vitro diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- **Make sure to put the strip in the correct direction. The first well is marked with a hole on the top right corner. Be careful not to invert the strip throughout PCR process.**
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipment required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles, and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" does not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because it does not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions, and procedures.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open format with internal control products Test Procedure and Annex 2 for Open format with extraction control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit has been validated in faecal samples. Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, faecal samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 24 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), It is recommended shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or ideally at -80°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The faecal specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> and 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).

8.2. RNA/DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

Due to VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit is also available with extraction control (References include in Annex 2), if the Extraction Control (EC) is used to monitor nucleic acid isolation and as PCR inhibition control, **add 5µL** of the reconstituted EC to the specimen and/or lysis buffer mixture (clinical specimen, as well as positive control and/or negative control). Close each tube and vortex for 10 seconds.

If the Extraction Control is used only as a PCR inhibition control, 1µL of the reconstituted EC should be added to the reconstituted Reaction-Mix.

For RNA/DNA extraction from faecal samples, you can use your manual or automatic routine optimized system, or any commercially available RNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. The following extraction kits have been validated:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).
- RIDA® Xtract (r-Biopharm).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC or 12gC instrument (Precision System Science Co.)

9. Result interpretation

9.1. References with internal control (references in Annex 1)

All the result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. Use the Positive Control amplification curve as a starting point during the run validation (before than interpretation of patient sample results), in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Gastrointestinal Panel I* positive control of each well.

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

Controls	Target detected ¹	Internal Control ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal ³	≤40	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls

1 In cases where one or more controls fail (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid' and retesting is required.

2. The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in control wells (PC and NC).

3. Note that amplification curves with Ct >37 may appear in channel Cy5 due to ambient *Campylobacter* (SCY well). Therefore, a cut-off Ct of 37 is set for this target.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

In case that all target genes of the different pathogens results are negative, IC must show an amplification signal with Ct less than 40. If there is an absence of signal or Ct value > 40 of the Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA/RNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

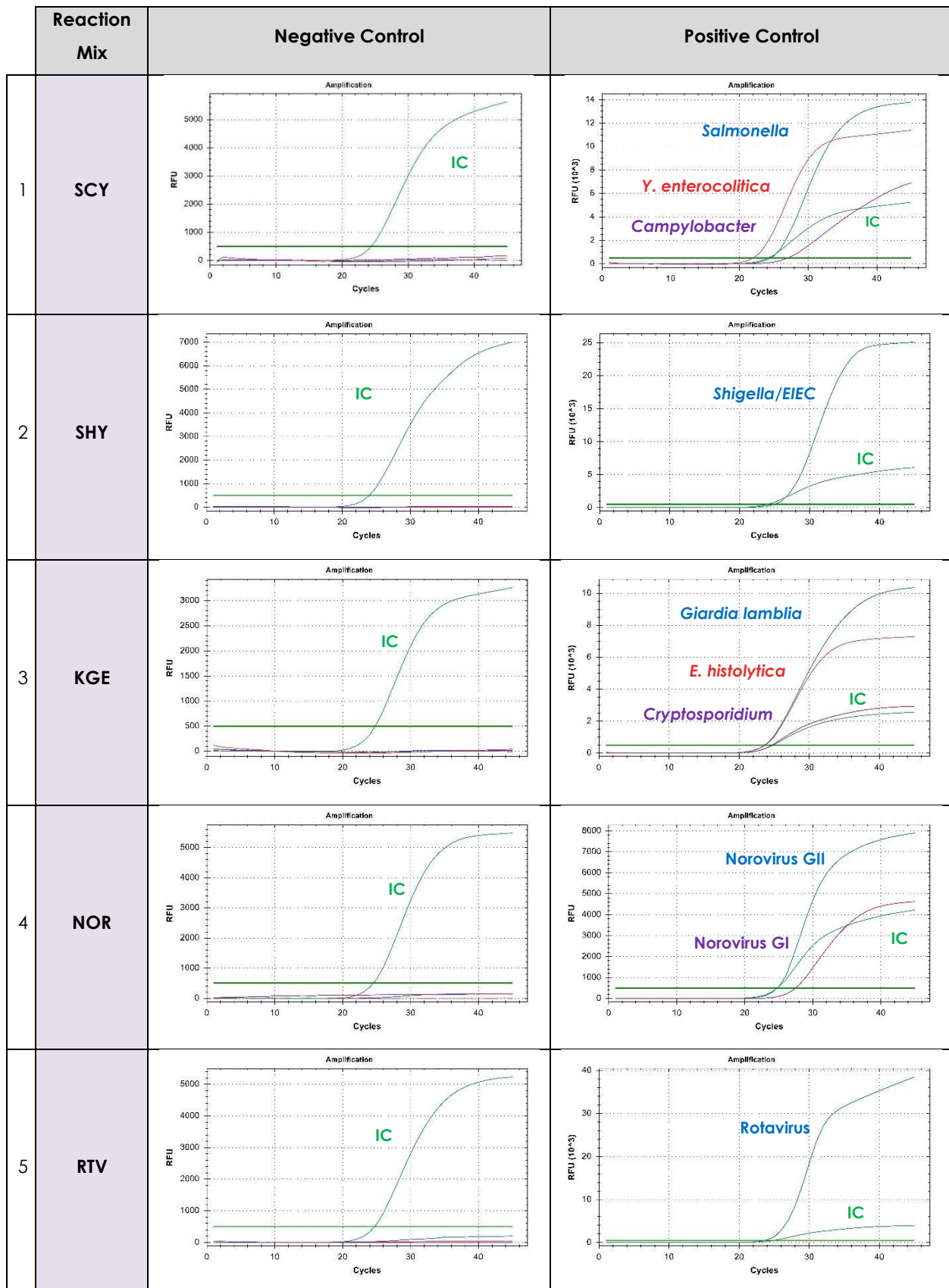
For interpretation of patient sample results, use the following table, read and analyse the results:

	Reaction Mix	Pathogens	Channels			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	SCY	<i>Salmonella</i>	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		<i>Yersinia enterocolitica</i>			Positive	
		<i>Campylobacter</i>				Positive*
2	SHY	<i>Shigella/EIEc</i>	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
3	KGE	<i>Giardia lamblia</i>	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		<i>Entamoeba histolytica</i>			Positive	
		<i>Cryptosporidium</i>				Positive
4	NOR	Norovirus GII	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		Norovirus GI				Positive
5	RTV	Rotavirus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
6	ADV	Adenovirus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
7	ATV	Astrovirus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
8	SAV	Sapovirus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		

Table 2. Interpretation of patient sample results. Positive: Amplification curve. Empty: No amplification curve.

* Note that amplification curves with Ct >37 may appear in channel Cy5 due to ambient *Campylobacter* (SCY well). Therefore, a cut-off Ct of 37 is set for this target.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user, to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.



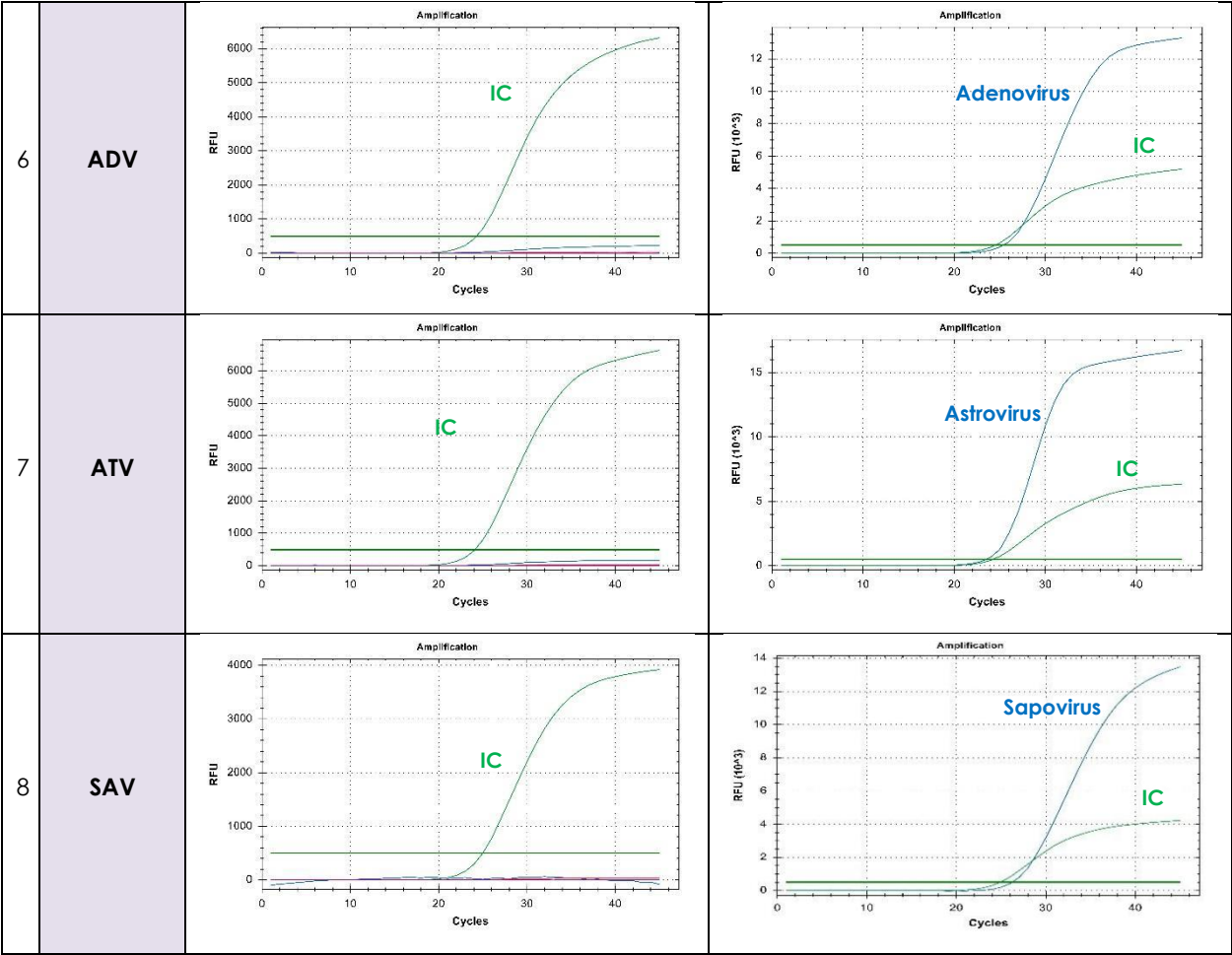


Table 3. Correct run of negative and positive controls run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

9.2. References with extraction control (references in Annex 2)

All the result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Extraction Control (EC) signal to verify the extraction procedure and correct functioning of the amplification mix (1 KGE reaction mix). The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. Use the Positive Control amplification curve as a starting point during the run validation (before than interpretation of patient sample results), to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Gastrointestinal Panel I* positive control of each well.

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

Controls	Targets detected ¹	Extraction/Internal Control ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal ³	≤40	Valid

Table 4. Expected Performance of Controls.

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

2 The Extraction/Internal Control (EC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in control wells (PC and NC). Differences can be observed in the values of Ct in the extraction controls between the controls and the clinical samples, due to the extraction process.

3. Note that amplification curves with Ct >37 may appear in channel Cy5 due to ambient *Campylobacter* (SCY well). Therefore, a cut-off Ct of 37 is set for this target.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

In case that all target genes of the different pathogens results are negative, EC must show an amplification signal with Ct less than 40. If there is an absence of signal or Ct value >40 of the Extraction Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA/RNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

The Extraction Control (EC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids. Differences can be observed in the values of Ct in the extraction control between the controls and the clinical samples, due to the extraction process.

For interpretation of patient sample results, use the following table, read, and analyse the results:

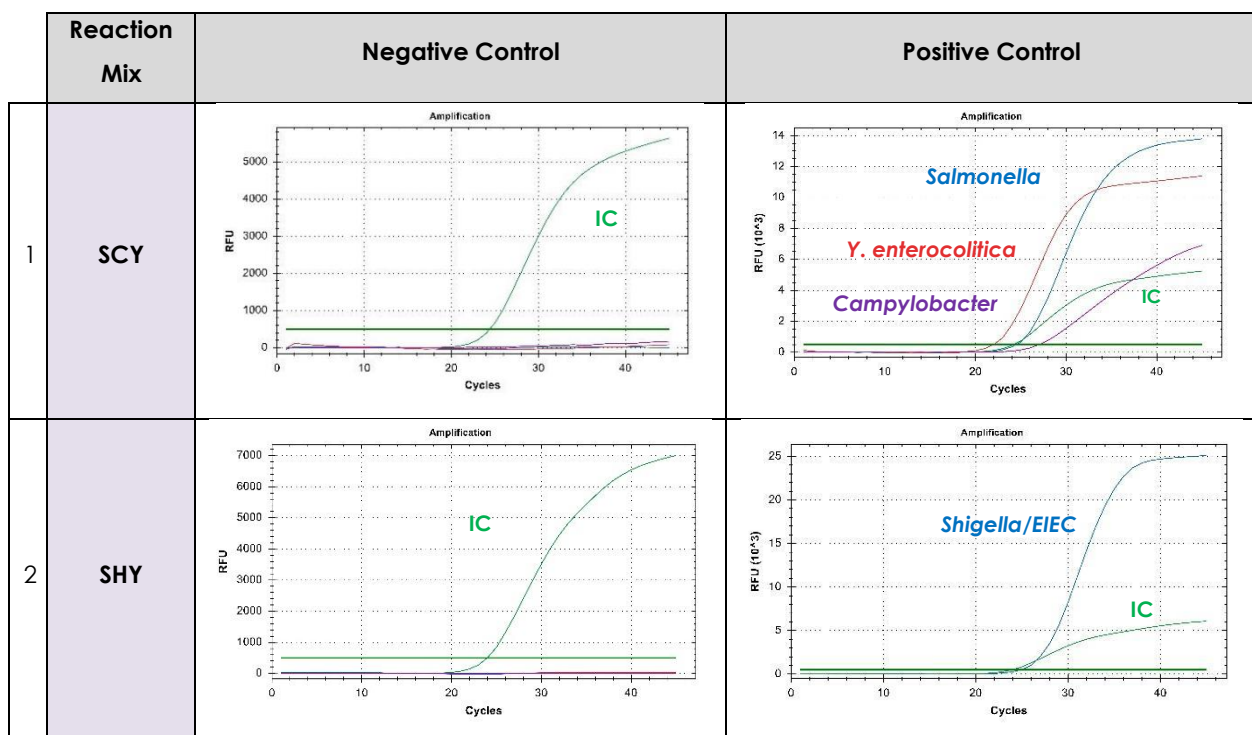
	Reaction Mix	Pathogens	Channels			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	SCY	<i>Salmonella</i>	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		<i>Yersinia enterocolitica</i>			Positive	
		<i>Campylobacter</i>				Positive*
2	SHY	<i>Shigella/EIEc</i>	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
3	1KGE	<i>Giardia lamblia</i>	Positive			
		Extraction Control		Positive/Negative		
		<i>Entamoeba histolytica</i>			Positive	

		<i>Cryptosporidium</i>				Positive
4	NOR	Norovirus GII	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		Norovirus GI				Positive
5	RTV	Rotavirus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
6	ADV	Adenovirus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
7	ATV	Astrovirus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
8	SAV	Sapovirus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		

Table 5. Interpretation of patient sample results. Positive: Amplification curve. Empty: No amplification curve.

* Note that amplification curves with Ct >37 may appear in channel Cy5 due to ambient *Campylobacter* (SCY well). Therefore, a cut-off Ct of 37 is set for this target.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user, to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.



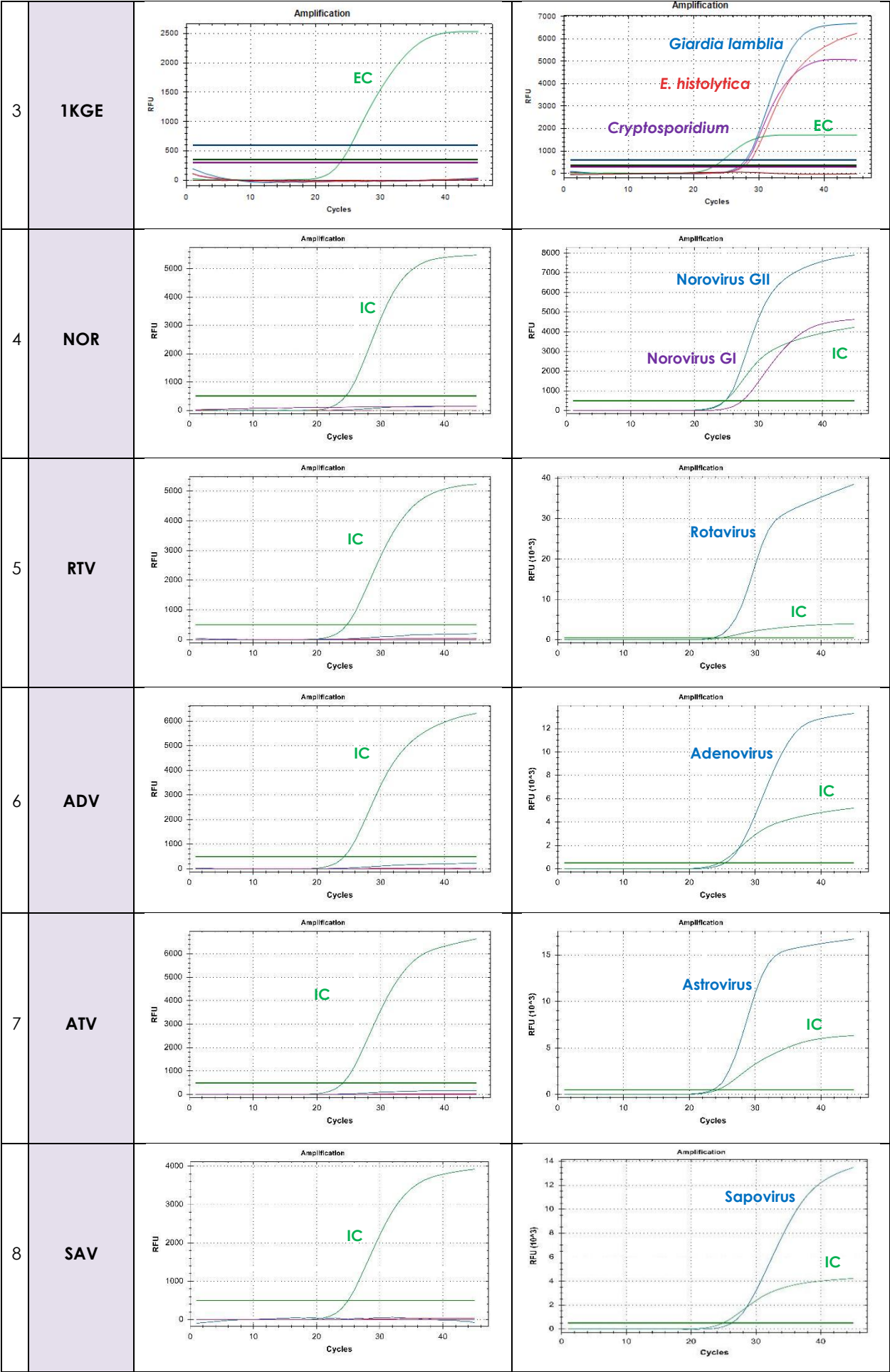


Table 6. Correct run of negative and positive controls run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with RNA/DNA extracted from faecal samples. See section 12 to check the matrix specimens validated.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; properly extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* and/or *E. histolytica*, NoV GI and/or NoV GII, RV, AdV, AstV and/or SaV, either the high number of DNA or cDNA template copies which contains each *Gastrointestinal Panel I* Positive Control vial, samples containing high concentrations of target RNA/DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and *Gastrointestinal Panel I* Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in a separate laboratory area.
- The specific primer and probe combinations for detection of the genes used in VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit designed for the detection of *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* and/or *E. histolytica*, NoV GI and/or NoV GII, RV, AdV, AstV and/or SaV, do not show significant combined homologies with the human genome or human microflora, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA/DNA extraction).
 - Degradation of the viral RNA/DNA and/or viral/bacterial DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* and/or *E. histolytica*, NoV GI and/or NoV GII, RV, AdV, AstV and/or SaV variants.
 - A viral/bacterial load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.

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

- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses/bacteria and does not imply that these viruses/bacteria are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets viral/bacterial sequences.

- Negative results or single target amplification do not preclude gastrointestinal infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak viral/bacterial levels during infections caused by *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* and/or *E. histolytica*, NoV GI and/or NoV GII, RV, AdV, AstV and/or SaV have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the pathogens.
- If diagnostic tests for other gastrointestinal illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* and/or *E. histolytica*, NoV GI and/or NoV GII, RV, AdV, AstV and/or SaV is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.

11. Quality control

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) or Extraction control (EC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit was tested using stool clinical samples from patients with clinical signs and symptoms of gastrointestinal infection. To determine the clinical diagnostic accuracy, a multicentre evaluation has been conducted through collaboration with national entities. A summary of the sites, sample type and workflow are included in the following table:

Site	Sample type	Workflow	Master Mix Code	Target
1 CerTest Biotec S.L., Parasitology Reference and Research Laboratory, Spanish National Centre for Microbiology (SNCM), Health Institute Carlos III (ISCIII), Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB)	Stool samples	Extracted and purified stool samples + DT Prime Real-Time PCR System (DNA Technologies)	GP01	<i>Salmonella</i>
				<i>Y. enterocolitica</i>
				<i>Campylobacter</i>
				<i>Shigella/EIEC</i>
				<i>G. lamblia</i>
				<i>E. histolytica</i>
				<i>Cryptosporidium</i> spp.
				Norovirus GI
				Norovirus GII
				Rotavirus
				Adenovirus

				Astrovirus
				Sapovirus

Table 7. Site, sample type, workflow and target

Besides, true positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values of VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Master Mix Code	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	Routine analysis *	GP01	<i>Salmonella</i>	12	164	0	0	1 (0.73-1)	1 (0.97-1)	1 (0.69-1)	1 (0.97-1)
			<i>Y. enterocolitica</i>	12	164	0	0	1 (0.73-1)	1 (0.97-1)	1 (0.69-1)	1 (0.97-1)
			<i>Campylobacter</i>	14	161	1	0	1 (0.76-1)	0.99 (0.96-1)	0.93 (0.66-0.99)	1 (0.97-1)
			<i>Shigella</i> /EIEC	10	166	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.97-1)	1 (0.65-1)	1 (0.97-1)
			<i>G. lamblia</i>	23	153	0	0	1 (0.85-1)	1 (0.97-1)	1 (0.82-1)	1 (0.96-1)
			<i>E. histolytica</i>	20	156	0	0	1 (0.83-1)	1 (0.97-1)	1 (0.79-1)	1 (0.97-1)
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	24	152	0	0	1 (0.85-1)	1 (0.97-1)	1 (0.82-1)	1 (0.96-1)
			Norovirus GI	3	172	1	0	1 (0.29-1)	0.99 (0.96-1)	0.75 (0.21-0.98)	1 (0.97-1)
			Norovirus GII	17	159	0	1	0.94 (0.72-0.99)	1 (0.97-1)	1 (0.77-1)	1 (0.97-1)
			Rotavirus	18	155	3	0	1 (0.81-1)	0.98 (0.94-0.99)	0.85 (0.62-0.96)	1 (0.96-1)
			Adenovirus	18	155	2	1	0.94 (0.74-0.99)	0.98 (0.95-0.99)	0.94 (0.74-0.99)	0.98 (0.95-0.99)
			Astrovirus	9	167	0	0	1 (0.66-1)	1 (0.97-1)	1 (0.62-1)	1 (0.97-1)
			Sapovirus	9	167	0	0	1 (0.66-1)	1 (0.97-1)	1 (0.62-1)	1 (0.97-1)

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

* Routine analysis: Culture method, MALDI-TOF mass spectrometry (if colonies were not easily identifiable) and immunochromatography for diagnosis of gastrointestinal viruses.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA/RNA copies per reaction for *Y. enterocolitica* (*ystB* gene); *Shigella*/EIEC; *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*; Norovirus GI and Norovirus GII; Rotavirus; Adenovirus; Astrovirus; and Sapovirus; a detection limit of ≥ 50 DNA copies per reaction for *Cryptosporidium*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica* (*ail* gene) and *Campylobacter*, with a positive rate of $\geq 95\%$.

12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Gastrointestinal Panel I* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

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

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit for ***Salmonella*, *Campylobacter* & *Y. enterocolitica* Reaction mix**, was evaluated against *Salmonella* (*Salmonella bongori* strain 1224.72, serotype Brookfield (66:z41:-); *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain LT2, serovar *typhimurium*, serotype 4,5,12:i:1,2; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *gallinarum*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *pullorum*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *paratyphi* A; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *paratyphi* B and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi*); *Campylobacter* (*Campylobacter coli*; *Campylobacter hyointestinalis* strain 80-4577-4; *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strain LMG 18455; *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* strain CCUG 24803) and *Yersinia enterocolitica* (*Yersinia enterocolitica* O:3 and *Yersinia enterocolitica* O:9), showing positive result.

The reactivity of VIASURE ***Shigella*/EIEC Reaction mix**, was evaluated against *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* and *Shigella sonnei*, showing positive result.

The reactivity of VIASURE ***Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction mix**, was evaluated against *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* strain DS4-868, showing positive result.

The reactivity of VIASURE ***Norovirus GI + GII Reaction mix***, was evaluated against *Norovirus GI* (genotypes GI.1, GI.3, GI.7, GI.8 and GI.Pb) and *Norovirus GII* (genotypes GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.4 New Orleans 2009, GII.4 Sydney 2012, GII.5, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.16, GII.17, GII.21, GII.b, GII.P4, GII.P17, GII.P21, GII.P16_GII.4 2012 recombinant, GII.P16_GII.2 recombinant, GII.Pe, G II.Pe_G II.4 and GII.Pg_GII.1), showing positive result.

The reactivity of VIASURE **Rotavirus Reaction mix**, was evaluated against human Rotavirus A strain ATCC® VR-2018TM (VP7 serotype 1 (G1)) and Rotavirus genotypes G1P[8], G2P[4], G2P[8], G3P[8], G4P[8], G1+G3P[8], G6P[8], G9P[8], G10+G12P[8], G12P[8] and G-UDP[8] strains, showing positive result.

The reactivity of VIASURE **Adenovirus Reaction mix**, was evaluated against Human Adenovirus 40 strain Dugan, Human Adenovirus 41 strain Tak, Human Adenovirus Type 31 strain 1315/63, Human Adenovirus type 1, Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6 and Human Adenovirus 5, Human Adenovirus type 6, showing positive result.

The reactivity of VIASURE **Astrovirus Reaction mix**, was evaluated against human Astrovirus serotypes I-VIII, showing positive result.

The reactivity of VIASURE **Sapovirus Reaction mix**, was evaluated against Sapovirus genotypes GI.1, GI.2, GI.3, GII.1, GII.2, GII.3 and OH8021/2008/JP-like (putative GI.5), showing positive result.

ANNEX 1

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>Gastrointestinal Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GP0112L
VIASURE <i>Gastrointestinal Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GP0112H

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition.

The reaction mixes places in each well of ***Gastrointestinal Panel I*** 8-well strip (GP01) allow the detection of the specific target pathogens through specific genes in the following channels (Table A1.2):

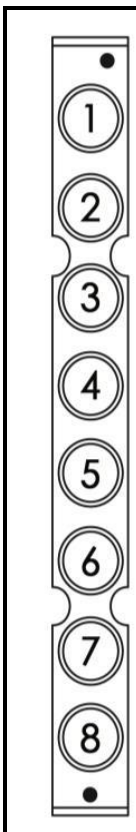
		Code	Target	Channel	Gene
	1	SCY	<i>Salmonella</i>	FAM	<i>invA</i>
			Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
			<i>Y. enterocolitica</i>	ROX	<i>ail</i> and <i>ystB</i>
			<i>Campylobacter</i>	Cy5	<i>16S rRNA</i>
	2	SHY	<i>Shigella/EIEC</i>	FAM	<i>ipaH</i>
			Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
	3	KGE	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	<i>18S rRNA</i>
			Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
			<i>E. histolytica</i>	ROX	<i>18S rRNA</i>
			<i>Cryptosporidium</i>	Cy5	<i>18S rRNA</i>
	4	NOR	<i>Norovirus GII</i>	FAM	<i>ORF1-ORF2</i>
			Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
			<i>Norovirus GI</i>	Cy5	<i>ORF1-ORF2</i>
	5	RTV	Rotavirus	FAM	<i>NSP3</i>
			Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
	6	ADV	Adenovirus	FAM	<i>Hexon</i>
			Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
	7	ATV	Astrovirus	FAM	<i>ORF1b</i>
			Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
	8	SAV	Sapovirus	FAM	<i>ORF1</i>
			Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A1 2. Target, channel and genes. *Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.cerfess.es. Note that the first well is marked with a hole on the top right corner.

A1.2 Reagents provided

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A1.4. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.cer-test.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Gastrointestinal Panel I</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Gastrointestinal Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA/DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-GP0112L and VS-GP0112H.

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control

Gastrointestinal Panel I Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Gastrointestinal Panel I* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A1.3.2 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips. **Make sure to put the strip in the correct direction (Table A1 2). The first well is marked with a hole on the top right corner.**

- 1) Reconstitute the number of strips you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA/DNA sample, reconstituted *Gastrointestinal Panel I* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in the 8 wells of each strip and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Reverse transcription	15 min	45°C
1	Initial denaturation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A1 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM, ROX, Cy5 and/or HEX (JOE or VIC) channels in the following Table A1.2. Depending on the equipment used select the proper detection channel consult website www.certest.es.

ANNEX 2

OPEN FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>Gastrointestinal Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GP0112LE
VIASURE <i>Gastrointestinal Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GP0112HE

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

The reaction mixes places in each well of ***Gastrointestinal Panel I*** 8-well strip (GP01) allow the detection of the specific target pathogens through specific genes in the following channels (Table A1.2):

	Code	Target	Channel	Gene
1	SCY	<i>Salmonella</i>	FAM	<i>invA</i>
		Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
		<i>Y. enterocolitica</i>	ROX	<i>ail</i> and <i>ystB</i>
		<i>Campylobacter</i>	Cy5	<i>16S rRNA</i>
2	SHY	<i>Shigella/EIEC</i>	FAM	<i>ipaH</i>
		Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
3	1KGE	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	<i>18S rRNA</i>
		Extraction Control (EC)	HEX, VIC or JOE *	-
		<i>E. histolytica</i>	ROX	<i>18S rRNA</i>
		<i>Cryptosporidium</i>	Cy5	<i>18S rRNA</i>
4	NOR	Norovirus <i>GII</i>	FAM	<i>ORF1-ORF2</i>
		Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
		Norovirus <i>GI</i>	Cy5	<i>ORF1-ORF2</i>
5	RTV	Rotavirus	FAM	<i>NSP3</i>
		Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
6	ADV	Adenovirus	FAM	<i>Hexon</i>
		Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
7	ATV	Astrovirus	FAM	<i>ORF1b</i>
		Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
8	SAV	Sapovirus	FAM	<i>ORF1</i>
		Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A2. 2. Target, channel and genes. *Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.certest.es. Note that the first well is marked with a hole on the top right corner.

A2.2 Reagents provided

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.4. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A2.4 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.cerTEST.es)

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Gastrointestinal Panel I</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	12x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Gastrointestinal Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA/DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-GP0112LE and VS-GP0112HE.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used for reconstitute the lyophilized *Gastrointestinal Panel I* Positive Control in an area away from the other components.

A2.3.2 Lyophilized positive control

Gastrointestinal Panel I Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Gastrointestinal Panel I* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A2.3.3 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips. **Make sure to put the strip in the correct direction (Table A2 2). The first well is marked with a hole on the top right corner.**

- 1) Reconstitute the number of strips you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the 8 wells of each strip for negative control.

Add 5 µL of RNA/DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Gastrointestinal Panel I* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

Close the wells with the caps provided. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Reverse transcription	15 min	45°C
1	Initial denaturation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A2. 4 PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM, ROX, Cy5 and/or HEX (JOE or VIC) channels in the following Table A1.2. Depending on the equipment used select the proper detection channel consult website www.certest.es.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Yersinia enterocolitica*; *Shigella*/EIEC; *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica*; Norovirus GI y/o Norovirus GII (NoV); Rotavirus (RV); Adenovirus (AdV); Astrovirus (AstV); y/o Sapovirus (SaV) en muestras de heces humanas procedentes de individuos con sospecha de infección gastrointestinal, por su profesional de la salud. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Y. enterocolitica*; *Shigella*/EIEC; *Cryptosporidium*, *G. lamblia* y/o *E. histolytica*; NoV GI y/o NoV GII; RV; AdV; AstV; y/o SaV en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos.

El RNA/DNA es extraído a partir de muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher) para detectar *Salmonella*, *Campylobacter* y *Y. enterocolitica*; *Shigella*/EIEC; *Cryptosporidium*, *G. lamblia* y *E. histolytica*; NoV GI y NoV GII; RV; AdV; AstV; y SaV.

2. Introducción y explicación

Virus, bacterias y/o parásitos pueden causar gastroenteritis, una inflamación del tracto gastrointestinal que afecta tanto al estómago como al intestino delgado. Las infecciones gastrointestinales son autolimitadas y se resuelven en pocos días. Sin embargo, en un entorno sanitario y en poblaciones específicas (recién nacidos/lactantes, pacientes inmunocomprometidos o poblaciones de personas mayores), son potencialmente graves. Por lo tanto, el diagnóstico rápido, el tratamiento adecuado y las medidas de control de infecciones son particularmente importantes en estos contextos.

El género *Salmonella* está dividido taxonómicamente en 6 subespecies de *Salmonella* entérica y en *Salmonella bongori*. *Salmonella* causa dos tipos de enfermedades: fiebre entérica (tifoidea) y gastroenteritis aguda, comúnmente llamada salmonelosis. La transmisión de la *Salmonella* se da a través de comida contaminada (aves de corral, productos avícolas, ternera, cerdo, huevos, leche y mariscos), agua o a través del contacto con animales infectados. Los pacientes infectados con *Salmonella* con frecuencia sufren náuseas, vómitos, dolor abdominal, dolores musculares, fiebre, diarrea intensa y/o dolores de cabeza.

El género *Campylobacter* consta de 26 especies, 2 especies provisionales y 9 subespecies. Las especies de *Campylobacter* más comúnmente asociadas con enfermedades humanas son *C. jejuni* y *C. coli*, pero existen otras especies que también pueden causar infecciones en humano. Las aves de corral son la mayor fuente de transmisión de *Campylobacter* a humanos. Otros factores de riesgo incluyen el consumo de productos de origen animal y agua, el contacto con animales e incluso la transmisión de persona a persona (vía fecal-oral o a través de vómitos). La infección por *Campylobacter* causa gastroenteritis caracterizada por fiebre, vómitos, dolores de cabeza y dolor abdominal con diarrea acuosa o con sangre, de una duración media de 6 días.

El género *Yersinia* incluye tres especies patógenas en humanos y animales: *Yersinia enterocolitica*, *pestis* y *pseudotuberculosis*. Hay seis biotipos de *Y. enterocolitica*; cinco de los cuales se consideran patógenos en humanos (biotipos 1B, 2, 3, 4 y 5). Además, hay 60 a 70 serotipos, entre los cuales O: 3, O: 9, O: 8, O: 5,27 están asociados con enfermedad en seres humanos. *Yersinia enterocolitica* es un patógeno de transmisión alimentaria

y sus manifestaciones clínicas suelen incluir náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea y fiebre. Hay indicios claros de que los alimentos de origen animal especialmente los productos de carne de cerdo y lácteos son los responsables de las infecciones humanas.

Shigellosis es un tipo de disentería bacilar caracterizada por una diarrea severa que contiene sangre y moco. La enfermedad es causada por cualquiera de las cuatro especies de *Shigella* (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*), por *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC). De hecho, la diferenciación de *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva es complicada debido a la capacidad para causar disentería usando el mismo método de invasión. Shigellosis es una enfermedad transmitida frecuentemente por alimentos, especialmente en comidas que requieren procesamiento y/o se preparan a partir de productos crudos o cocidos previamente sin recalentar. La baja dosis infectiva (10 células), permite que la enfermedad pueda propagarse eficazmente por los alimentos o el agua infectada y también mediante el contacto entre personas.

Cryptosporidium puede transmitirse por varias vías: contacto persona a persona y con animales de compañía y/o de granja, así como ingestión de alimentos, aguas potables y aguas para uso recreativo contaminados. *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.

Norovirus (NoV) pertenece a la familia de *Caliciviridae* y se considera la principal causa de gastroenteritis aguda no bacteriana en todos los grupos de edad en todo el mundo. NoVs se clasifican en seis genogrupos distintos (GI-GVI) basados en el árbol filogenético inferido por la comparación de la secuencia peptídica completa de VP1. En particular, los genogrupos GI, GII y GIV infectan a los seres humanos. Tras un período de incubación de 12 a 48 h, la enfermedad causada por Norovirus se caracteriza por vómitos en proyectil, diarrea sin sangre, náuseas, calambres abdominales y fiebre de bajo grado. Los Norovirus pueden infectar a los humanos a través de múltiples vías, incluyendo la vía oral, transmitida a través del contacto con la materia fecal o por aerosolización de los vómitos de las personas infectadas, así como las superficies contaminadas, los alimentos o el agua.

La infección por Rotavirus (RV) es la principal causa en todo el mundo de la gastroenteritis severa en bebés y niños menores de 5 años. El género Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*. Rotavirus se pueden dividir en 7 grupos distintos (A-G). Los serogrupos de Rotavirus A-C son patógenos humanos, aunque Rotavirus A produce más del 90% de las infecciones. La principal vía de transmisión es la fecal-oral debido a la contaminación de comida, agua u objetos. Los síntomas característicos son vómitos, diarrea acuosa y dolor abdominal. Los Adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae* de virus no encapsulados de DNA bicatenario (dsDNA).

Existen más de 50 serotipos inmunológicamente diferenciados de Adenovirus humanos agrupados en 6 especies (AdVH-A hasta AdVH-F) que pueden causar infecciones en seres humanos que van desde enfermedades

respiratorias (principalmente AdVH-B y C), y conjuntivitis (AdVH-B y D), hasta gastroenteritis (serotipos AdVH-F 40 y 41). Adicionalmente a estos últimos, los serotipos AdVH 31, 12, 18, 1, 2, 5 y 6 se han visto también asociados con diarrea aguda. Aunque las características epidemiológicas de Adenovirus varían por tipo, todos se transmiten por contacto directo o por vía fecal-oral y son considerados patógenos para todos los grupos de edad de la población independientemente de la edad, especialmente para los niños. De hecho, estos virus son altamente infecciosos y unas pocas partículas virales son suficientes para causar infección.

Los Astrovirus humanos (HAstVs) pertenecen a la familia *Astroviridae*. Los 8 serotipos clásicos de HAstVs representan el 2-9% de todas las gastroenteritis agudas no bacterianas en niños de todo el mundo, aunque también han sido registradas infecciones en adultos sanos, personas mayores y pacientes inmunocomprometidos. Típicamente, la infección por HAstV induce una diarrea leve y acuosa que dura de 2 a 3 días, junto con vómitos, fiebre, anorexia y dolor abdominal. La infección se transmite fundamentalmente a través de la vía fecal-oral, a pesar de que los alimentos y el agua pueden actuar como vehículos de transmisión de virus entéricos humanos.

Los Sapovirus (SaV), anteriormente conocidos como "virus Sapporo-like," pertenecen a la familia *Caliciviridae* y causan gastroenteritis aguda en humanos y ganado porcino. Se han descrito 15 genotipos agrupados en cuatro genogrupos (GI.1 a GI.8, GII.1 a GII.5, GIV, y GV) como causantes de infección en seres humanos. SaV se considera una causa importante de gastroenteritis en niños menores de 5 años, mientras que en los adultos su importancia es menor. Los síntomas clínicos de infección por sapovirus se cree que son más leves que los síntomas asociados con norovirus, que incluyen diarrea acuosa leve o aguda, calambres en el estómago, náuseas, vómitos y ocasionalmente fiebre. SaVs se pueden transmitir a través de la vía fecal-oral a partir de agua y alimentos contaminados, así como por contacto de persona a persona.

El cultivo, la detección de antígeno, la microscopía se han considerado los métodos gold standard para el diagnóstico de estos patógenos, sin embargo, requiere mucho tiempo y no es muy sensible. El ensayo de PCR en tiempo real requiere menos mano de obra y tiene mayor sensibilidad y especificidad, por lo que es una alternativa atractiva.

3. Procedimiento

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección cualitativa de DNA/RNA de *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* y/o *E. histolytica*, NoV GI y/o NoV GII, RV, AdV, AstV y/o SaV en muestras de heces. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de AdV, *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* y/o *E. histolytica* se lleva a cabo mediante la amplificación de una región conservada de genes específicos y sondas marcadas con fluorescencia. Después del aislamiento del RNA, la detección de los virus de RNA NoV GI, NoV GII, RV, AtV and SaV se lleva a cabo mediante un paso de transcripción inversa y la posterior amplificación de la secuencia diana específica, donde simultáneamente se lleva a cabo la RT-PCR. La diana de RNA aislada se transcribe generando DNA complementario mediante la transcriptasa inversa, seguida de la amplificación de una región conservada de genes específicos utilizando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit 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 RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como un control interno para monitorizar la inhibición de la PCR (si está presente).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para open format con productos con control interno y el anexo 2 para open format con productos con control de extracción.

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 *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas).
- Kit de extracción de DNA/RNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 μL , 20-200 μL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics), Rotor-Gene® Q (Qiagen), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y DTLite Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology). Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.

- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control 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 utilizar reactivos si el desecante no está presente o está roto dentro de las bolsas de reactivos.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- 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.
- **Asegurar de colocar la tira en la dirección correcta. El primer pocillo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha. Tenga cuidado de no invertir la tira durante el proceso de PCR.**
- 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 de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test *VIASURE Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. 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.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, e fumar o aplique de 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) nº 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" no requiere ficha de datos de seguridad debido a que se clasifica como no peligroso 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) nº 1272/2008 (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.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para open format con productos con control interno y el Anexo 2 para open format con productos con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection kit ha sido validado en muestras de heces. Otros tipos de muestras diferentes deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras de heces se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes pueden ser transportados entre 2-8°C hasta 24 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas.

Para transportes largos de duración mayor de 24 horas, se recomienda realizar el envío a -20°C o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 24 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -80°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras de heces deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> y Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Sitio web <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) y la guía 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).

8.2. Extracción de RNA/DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Debido a que VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit está también disponible con control de extracción (las referencias se incluyen en el Anexo 2), si el control de extracción (CE) se utiliza para monitorizar el aislamiento del ácido nucleico y como control de inhibición de la PCR, **agregar 5µL** de CE reconstituido a la muestra y/o mezcla de tampón de lisis (muestra clínica, así como control positivo y/o negativo). Cerrar el tubo y agitar en el vórtex durante 10 segundos.

Si el control de extracción se usa solo como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1µL del CE reconstituido a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de RNA/DNA a partir de muestras de heces, puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático o cualquier kit de extracción de RNA/DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).
- RIDA® Xtract (r-Biopharm).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 6gC or 12gC instrument (Precision System Science Co.)

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexo 1)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Verifique la señal de control interno para verificar el

correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores de umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. Utilizar la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la ejecución (antes de la interpretación de los resultados de la muestra del paciente), para asegurarse de que los umbrales caen dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a diferentes intensidades de señal.

El uso de controles positivos y negativos en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para *Gastrointestinal Panel I* en el pocillo de control positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Dianas detectadas ¹	Control Interno ²	Interpretación de Controles
Control Positivo (PC)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (NC)	>40 o sin señal ³	≤40	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles.

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 "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control Interno (IC) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40 en los pocillos del CP y CN)).

3 Tenga en cuenta que pueden aparecer curvas de amplificación con Ct >37 en el canal Cy5 debido a *Campylobacter* ambiental (pocillo SCY). Por lo tanto, se establece un Ct de corte de 37 para esta diana.

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

En caso de que los resultados de todos los genes diana de los diferentes patógenos sean negativos, IC debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor que 40. Si hay ausencia de señal o un valor de Ct >40 del control interno, el resultado se considera como "inválido", y se requiere una nueva prueba. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA/RNA 1:10 y/o 1:100, o volver a extraer y volver a realizar la prueba para verificar posibles fallos en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o ninguna señal). A veces, su detección no es necesaria porque un número elevado de copias de la diana puede provocar una amplificación preferencial de los ácidos nucleicos específicos de la diana.

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

	Mezcla de Reacción	Patógenos	Canales			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	SCY	<i>Salmonella</i>	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
		<i>Yersinia enterocolitica</i>			Positivo	
		<i>Campylobacter</i>				Positivo*
2	SHY	<i>Shigella/EIEc</i>	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
3	KGE	<i>Giardia lamblia</i>	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
		<i>Entamoeba histolytica</i>			Positivo	
		<i>Cryptosporidium</i>				Positivo
4	NOR	Norovirus GII	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
		Norovirus GI				Positivo
5	RTV	Rotavirus	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
6	ADV	Adenovirus	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
7	ATV	Astrovirus	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
8	SAV	Sapovirus	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		

Tabla 2. Interpretación de los resultados de muestras de pacientes. Positivo: curva de amplificación. Vacío: sin curva de amplificación.

* Tenga en cuenta que pueden aparecer curvas de amplificación con Ct >37 en el canal Cy5 debido a *Campylobacter* ambiental (pocillo SCY). Por lo tanto, se establece un Ct de corte de 37 para esta diana.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la RT-qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

Mezcla de Reacción		Control Positivo	Control Negativo
1	SCY		
2	SHY		
3	KGE		
4	NOR		
5	RTV		

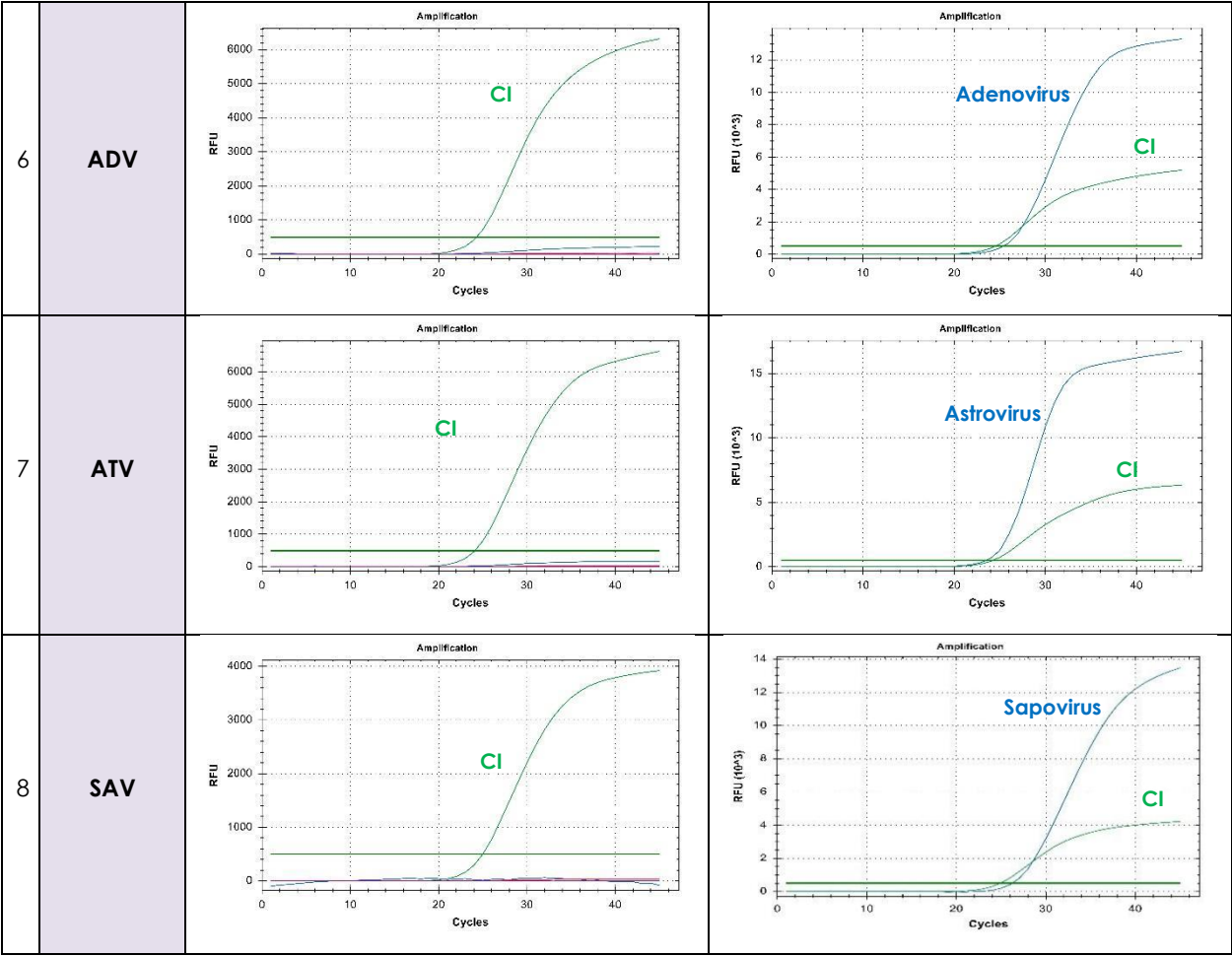


Tabla 3. Ejecución de los controles positivos y negativos en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexo 2)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Verifique la señal de control de extracción (CE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación (1KGE reaction mix). El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores de umbral par cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. Utilizar la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la ejecución (antes de la interpretación de los resultados e la muestra del paciente), para asegurarse de que los umbrales caen dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a diferentes intensidades de señal.

El uso de controles positivos y negativos en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para *Gastrointestinal Panel I* en el pocillo de control positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Dianas detectadas ¹	Control Interno/de Extracción ²	Interpretación de los controles
Control Positivo (PC)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (NC)	>40 o sin señal ³	≤40	Válido

Tabla 4. Rendimiento esperado de los controles.

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 "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de extracción (EC) debería mostrar una señal de amplificación ($C_t \leq 40$ en los pocillos del CP y CN)). En los controles de extracción se pueden observar diferencias en los valores de C_t entre las muestras control (control negativo y control positivo) y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

3 Tenga en cuenta que pueden aparecer curvas de amplificación con $C_t > 37$ en el canal Cy5 debido a *Campylobacter* ambiental (pocillo SCY). Por lo tanto, se establece un C_t de corte de 37 para esta diana

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

En caso de que los resultados de todos los genes diana de los diferentes patógenos sean negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con C_t menor que 40. Si hay una ausencia de señal o un valor de $C_t > 40$ del control de extracción, el resultado se considera como "inválido", y se requiere una nueva prueba. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o volver a extraer y volver a realizar la prueba para verificar posibles fallos en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

El control de extracción (EC) muestra o no una señal de amplificación ($C_t \leq 40$ o ninguna señal). A veces, su detección no es necesaria porque un número elevado de copias de la diana puede provocar una amplificación preferencial de los ácidos nucleicos específicos de la diana. Se pueden observar diferencias entre los valores de C_t en el control de extracción entre los controles y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

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

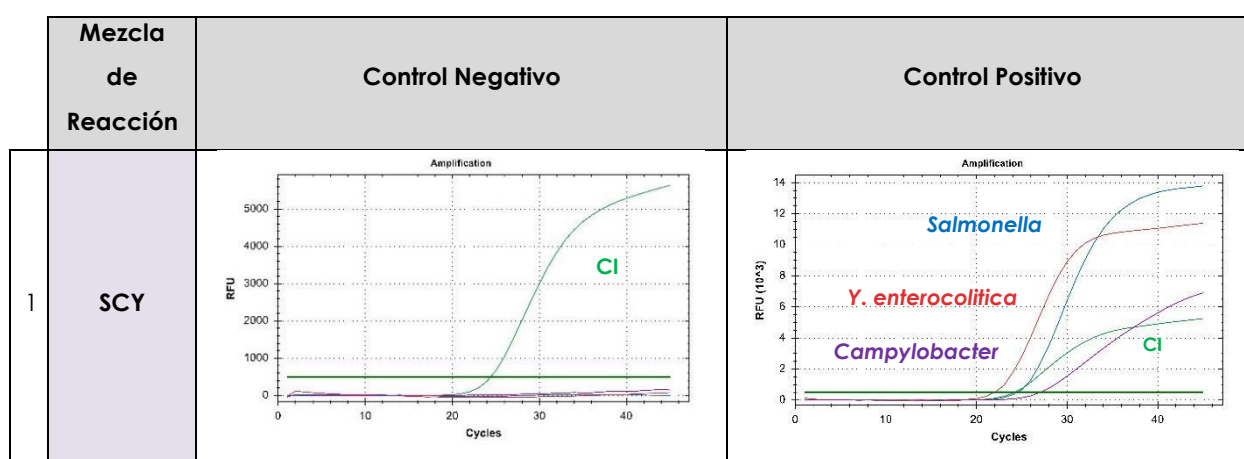
	Mezcla de Reacción	Patógenos	Canales			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	SCY	<i>Salmonella</i>	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
		<i>Yersinia enterocolitica</i>			Positivo	
		<i>Campylobacter</i>				Positivo*
2	SHY	<i>Shigella</i> /EIEC	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
3	1KGE	<i>Giardia lamblia</i>	Positivo			

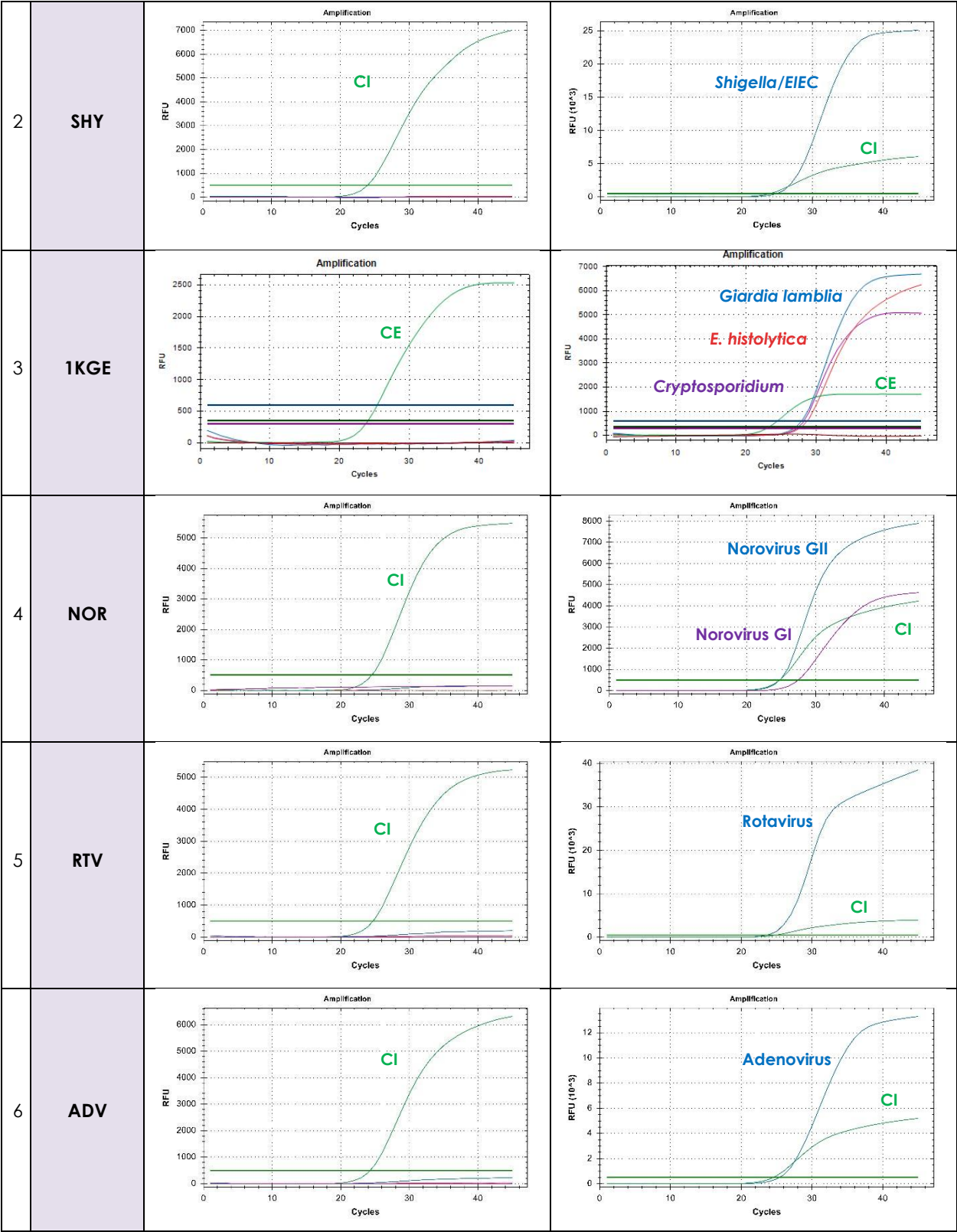
		Control de Extracción		Positivo/Negativo		
		<i>Entamoeba histolytica</i>			Positivo	
		<i>Cryptosporidium</i>				Positivo
4	NOR	Norovirus GII	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
		Norovirus GI				Positivo
5	RTV	Rotavirus	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
6	ADV	Adenovirus	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
7	ATV	Astrovirus	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		
8	SAV	Sapovirus	Positivo			
		Control Interno		Positivo/Negativo		

Tabla 5. Interpretación de los resultados de muestras de pacientes. Positivo: curva de amplificación. Vacío: sin curva de amplificación.

* Tenga en cuenta que pueden aparecer curvas de amplificación con Ct >37 en el canal Cy5 debido a *Campylobacter* ambiental (pocillo SCY). Por lo tanto, se establece un Ct de corte de 37 para esta diana.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la RT-qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.





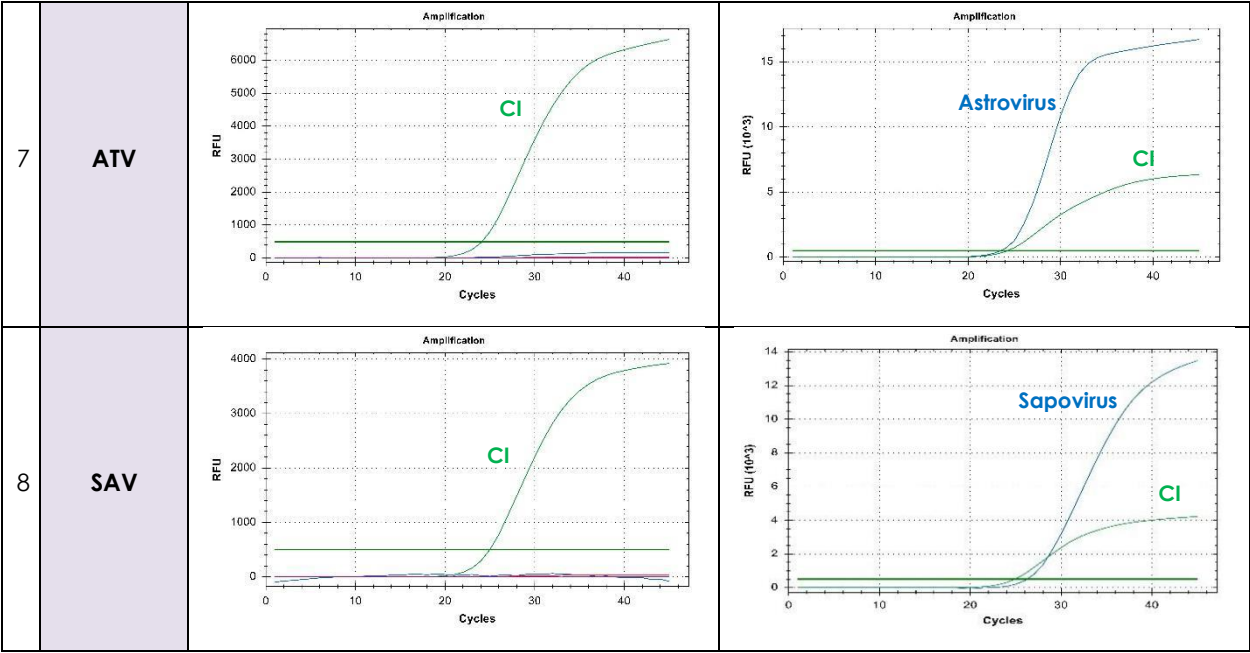


Tabla 6. Ejecución de los controles positivos y negativos en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

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.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con RNA/DNA extraído de muestras de heces. Consulte la sección 12 para comprobar las matrices de las muestras validadas.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- 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 *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* y/o *E. histolytica*, NoV GI y/o NoV GII, RV, AdV, AstV y/o SaV., ya sea por el gran número de copias de molde DNA o cDNA que contiene cada vial *Gastrointestinal Panel I* Positive Control, muestras que contienen altas concentraciones de RNA/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 *Gastrointestinal Panel I* 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 de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Las combinaciones de cebadores y sondas específicas para la detección de los genes usadas en VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit diseñado para la detección de *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* y/o *E. histolytica*, NoV GI y/o NoV GII, RV, AdV, AstV y/o SaV, no mostraron homologías combinadas significativas con el genoma humano y con la microflora humana que pudiera originar falsos positivos predecibles.

- 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 RNA/DNA).
 - Degradación del RNA/DNA viral y/o DNA viral/bacteriano durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* y/o *E. histolytica*, NoV GI y/o NoV GII, RV, AdV, AstV y/o SaV, Una carga viral/bacteriana en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - 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.

- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus/bacterias viables y no implica que estos virus 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 virales/bacterianas diana.
- Resultados negativos o la amplificación de una única diana no excluyen padecer infección gastrointestinal 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 o bacteriana durante las infecciones causadas por *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* y/o *E. histolytica*, NoV GI y/o NoV GII, RV, AdV, AstV y/o SaV. 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 *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Y. enterocolitica*, *Shigella/EIEC*, *Cryptosporidium*, *G. lamblia* y/o *E. histolytica*, NoV GI y/o NoV GII, RV, AdV, AstV y/o SaV, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.

11. Control de calidad

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) o 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

La sensibilidad y especificidad clínica de VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit fue evaluada utilizando muestras clínicas de heces procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal realizando diferentes evaluaciones multicéntricas en colaboración con entidades nacionales e

internacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado.

Lugar	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Código Mezcla reacción	Diana
1	CerTest Biotec S.L., Parasitology Reference and Research Laboratory, Spanish National Centre for Microbiology (SNCM), Health Institute Carlos III (ISCIII), Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB)	Muestras de heces	GP01	<i>Salmonella</i>
				<i>Y. enterocolitica</i>
				<i>Campylobacter</i>
				<i>Shigella</i> /EIEC
				<i>G. lamblia</i>
				<i>E. histolytica</i>
				<i>Cryptosporidium</i> spp.
				Norovirus GI
				Norovirus GII
				Rotavirus
				Adenovirus
				Astrovirus
				Sapovirus

Tabla 7. Resumen de los centros, tipos de muestra y flujo de trabajo llevado a cabo durante las evaluaciones clínicas.

Por otro lado, los valores positivos y negativos, falsos positivos y negativos, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Ensayo comparador	Código mezcla reacción	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	Análisis rutinario*	GP01	<i>Salmonella</i>	12	164	0	0	1 (0.73-1)	1 (0.97-1)	1 (0.69-1)	1 (0.97-1)
			<i>Y. enterocolitica</i>	12	164	0	0	1 (0.73-1)	1 (0.97-1)	1 (0.69-1)	1 (0.97-1)
			<i>Campylobacter</i>	14	161	1	0	1 (0.76-1)	0.99 (0.96-1)	0.93 (0.66-0.99)	1 (0.97-1)
			<i>Shigella</i> /EIEC	10	166	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.97-1)	1 (0.65-1)	1 (0.97-1)
			<i>G. lamblia</i>	23	153	0	0	1 (0.85-1)	1 (0.97-1)	1 (0.82-1)	1 (0.96-1)
			<i>E. histolytica</i>	20	156	0	0	1 (0.83-1)	1 (0.97-1)	1 (0.79-1)	1 (0.97-1)
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	24	152	0	0	1 (0.85-1)	1 (0.97-1)	1 (0.82-1)	1 (0.96-1)
			Norovirus GI	3	172	1	0	1 (0.29-1)	0.99 (0.96-1)	0.75 (0.21-0.98)	1 (0.97-1)
			Norovirus GII	17	159	0	1	0.94 (0.72-0.99)	1 (0.97-1)	1 (0.77-1)	1 (0.97-1)
			Rotavirus	18	155	3	0	1 (0.81-1)	0.98 (0.94-0.99)	0.85 (0.62-0.96)	1 (0.96-1)
			Adenovirus	18	155	2	1	0.94 (0.74-0.99)	0.98 (0.95-0.99)	0.94 (0.74-0.99)	0.98 (0.95-0.99)

			Astrovirus	9	167	0	0	1 (0.66-1)	1 (0.97-1)	1 (0.62-1)	1 (0.97-1)
			Sapovirus	9	167	0	0	1 (0.66-1)	1 (0.97-1)	1 (0.62-1)	1 (0.97-1)

Tabla 8. Valores positivo y negativo verdaderos, valores positivo y negativo falsos, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit.

* Análisis rutinario: Cultivo, espectrometría de masas MALDI-TOF (si las colonias no eran fácilmente identificables) e inmunocromatografía para diagnóstico de virus gastrointestinales.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 RNA/DNA copias por reacción para *Y. enterocolitica* (*ystB* gene); *Shigella*/EIEC; *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*; Norovirus GI and Norovirus GII; Rotavirus; Adenovirus; Astrovirus; and Sapovirus; un límite de detección de ≥ 50 DNA copias por reacción *Cryptosporidium*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica* (*ail* gene) and *Campylobacter*, con una tasa de positividad del 95%.

12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo del Respiratory Panel III 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 detectó reactividad cruzada entre casi ninguno de los siguientes microorganismos probados, excepto los patógenos específicos de cada ensayo.

Prueba de reacción cruzada					
<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Campylobacter coli</i>	-/+	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-/+	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-/+
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-/+	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-/+
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-/+	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-/+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	<i>Aeromonas caviae</i>	-
<i>Salmonella typhi</i>	-/+	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	Adenovirus serotipos 40/41	-/+
<i>Salmonella paratyphi</i> A	-/+	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	Rotavirus A	-/+
<i>Salmonella paratyphi</i> B	-/+	<i>Clostridium difficile</i>	-	Astrovirus genotipo I-VIII	-/+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-/+	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Sapovirus	-/+
<i>Salmonella bongori</i>	-/+	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-/+
<i>Salmonella enteritidis</i>	-/+	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	-/+	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i>	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-/+	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-/+
<i>Salmonella gallinarum</i>	-/+	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-/+
<i>Campylobacter lari</i>	-/+	<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Blastocystis hominis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-/+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Norovirus Genotipos I y II	-/+

Tabla 9. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit para ***Salmonella*, *Campylobacter* & *Y. enterocolitica* Reaction mix**, se evaluó frente a *Salmonella* (*Salmonella bongori* cepa 1224.72, serotipo Brookfield (66:z41:-); *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar enteritidis; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* cepa LT2, serovar typhimurium, serotipo 4,5,12:i:1,2; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar gallinarum; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar pullorum; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar paratyphi A; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar paratyphi B y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar thyphi); *Campylobacter* (*Campylobacter coli*; *Campylobacter hyointestinalis* cepa 80-4577-4; *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* cepa LMG 18455; *Campylobacter lari* y *Campylobacter upsaliensis* cepa CCUG 24803) y *Yersinia enterocolitica* (*Yersinia enterocolitica* O:3 y *Yersinia enterocolitica* O:9) mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE ***Shigella*/EIEC Reaction mix**, se evaluó frente a *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE ***Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Reaction mix**, se evaluó frente a *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* cepa DS4-868, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE ***Norovirus GI + GII Reaction mix***, se evaluó frente a *Norovirus GI* (genotipos GI.1, GI.3, GI.7, GI.8 y GI.Pb) y *Norovirus GII* (genotipos GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.4 New Orleans 2009, GII.4 Sydney 2012, GII.5, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.16, GII.17, GII.21, GII.b, GII.P4, GII.P17, GII.P21, GII.P16_GII.4 2012 recombinant, GII.P16_GII.2 recombinant, GII.Pe, G II.Pe_G II.4 y GII.Pg_GII.1), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE ***Rotavirus Reaction mix***, se evaluó frente a a células infectadas con Rotavirus A humano cepa ATCC® VR-2018TM (VP7 serotipo 1 (GI)) y frente a los genotipos de Rotavirus G1P[8], G2P[4], G2P[8], G3P[8], G4P[8], G1+G3P[8], G6P[8], G9P[8], G10+G12P[8], G12P[8] y cepa G-UDP[8], mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE ***Adenovirus Reaction mix***, se evaluó frente a Adenovirus humano 40 cepa Dugan, Adenovirus humano 41 cepa Tak, Adenovirus humano tipo 31 cepa 1315/63, Adenovirus humano tipo 1, Adenovirus humano 2 cepa Adenoid 6 y Adenovirus humano 5, Adenovirus humano tipo 6, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE ***Astrovirus Reaction mix***, se evaluó frente a Astrovirus serotipos I-VIII, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE ***Sapovirus Reaction mix***, se evaluó frente a Sapovirus genotypes GI.1, GI.2, GI.3, GII.1, GII.2, GII.3 and OH8021/2008/JP-like (putative GI.5), mostrando un resultado positivo.

ANEXO 1

OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GP0112L
VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GP0112H

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Las zonas de mezcla de reacción en cada pocillo de la tira de 8 pocillos de **Gastrointestinal Panel I** (GP01) permiten la detección de los patógenos diana específicos a través de genes específicos en los siguientes canales (Tabla A1.2):

	Código	Diana	Canal	Gen	
	1	SCY	<i>Salmonella</i>	FAM	<i>invA</i>
			Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
			<i>Y. enterocolitica</i>	ROX	<i>ail</i> and <i>ystB</i>
			<i>Campylobacter</i>	Cy5	<i>16S rRNA</i>
	2	SHY	<i>Shigella/EIEC</i>	FAM	<i>ipaH</i>
			Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
	3	KGE	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	<i>18S rRNA</i>
			Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
			<i>E. histolytica</i>	ROX	<i>18S rRNA</i>
			<i>Cryptosporidium</i>	Cy5	<i>18S rRNA</i>
	4	NOR	<i>Norovirus GII</i>	FAM	<i>ORF1-ORF2</i>
			Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
			<i>Norovirus GI</i>	Cy5	<i>ORF1-ORF2</i>
	5	RTV	Rotavirus	FAM	<i>NSP3</i>
			Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
	6	ADV	Adenovirus	FAM	<i>Hexon</i>
Control Interno (CI)			HEX, VIC or JOE *	-	
7	ATV	Astrovirus	FAM	<i>ORF1b</i>	
		Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-	
8	SAV	Sapovirus	FAM	<i>ORF1</i>	
		Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-	

Tabla A1. 1. Diana, canal y genes. * seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A1.2. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cer-test.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Gastrointestinal Panel I</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Gastrointestinal Panel I</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GP0112L y VS-GP0112H.

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Gastrointestinal Panel I* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Gastrointestinal Panel I* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.2 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras. **Asegúrese de colocar la tira en la dirección correcta (Tabla A1.2). El primer pozo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha.**

- 1) Reconstituir el número de tiras que sean necesarias.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA/DNA extraído de cada muestra, de *Gastrointestinal Panel I* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para comprobar la compatibilidad ver Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Retrotranscripción	15 min	45°C
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A1. 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM, ROX, Cy5 y/o HEX (JOE o VIC) (Tabla A1.2). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (consultar la web www.certest.es).

ANEXO 2

OPEN FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GP0112LE
VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GP0112HE

Tabla A2. 2. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE Gastrointestinal Panel I Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Las zonas de mezcla de reacción e cada pocillo de la tira de 8 pocillos del **Gastrointestinal Panel I** (GP01) permiten la detección de los patógenos diana específicos a través de genes específicos en los siguientes canales (Tabla A2.2):



	Code	Target	Channel	Gene
1	SCY	Salmonella	FAM	invA
		Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
		Y. enterocolitica	ROX	ail and ystB
		Campylobacter	Cy5	16S rRNA
2	SHY	Shigella/EIEC	FAM	ipaH
		Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
3	1KGE	Giardia lamblia	FAM	18S rRNA
		Control de extracción (CE)	HEX, VIC or JOE *	-
		E. histolytica	ROX	18S rRNA
		Cryptosporidium	Cy5	18S rRNA
4	NOR	Norovirus GII	FAM	ORF1-ORF2
		Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
		Norovirus GI	Cy5	ORF1-ORF2
5	RTV	Rotavirus	FAM	NSP3
		Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
6	ADV	Adenovirus	FAM	Hexon
		Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
7	ATV	Astrovirus	FAM	ORF1b
		Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
8	SAV	Sapovirus	FAM	ORF1
		Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A2. 3. Diana, canal y genes. * seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla A2.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cer-test.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Gastrointestinal Panel I</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Gastrointestinal Panel I</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A2. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Gastrointestinal Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GP0112LE y VS-GP0112HE.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNasa/DNasa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el *Gastrointestinal Panel I* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A2.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Gastrointestinal Panel I* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Gastrointestinal Panel I* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A2.3.3 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras. **Asegúrese de colocar la tira en la dirección correcta (Tabla A2.2). El primer pocillo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha.**

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los 8 pocillos de cada tira reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de RNA/DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Gastrointestinal Panel I* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra/control positivo/control negativo.

Cerrar los pocillos con las tapas provistas. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para comprobar la compatibilidad del termociclador ver Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Retrotranscripción	15 min	45°C
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A3. 5. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM, ROX, Cy5 y/o HEX (JOE o VIC) (Tabla A1.2). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (consultar la web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía

1. J. Hoorfar, et al. Automated 59 Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 3429–3435.
2. D. Rodríguez-Lázaro et al. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *Journal of Microbiological Methods* 2003; 54: 381– 390.
3. F. Barletta et al. Multiplex real-time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Shigella*. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51: 2822-2829.
4. N.O. Kaakoush et al. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2015; 28(3): 687-720.
5. S.M. Man. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2011; 8(12): 669-685.
6. R.F. de Boer et al. Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(1): 253-259.
7. N. Botteldoorn et al. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 105(6):1909-1918.
8. M. Arrausi-Subiza, et al. Evaluation of different enrichment methods for pathogenic *Yersinia* species detection by real time PCR. *BMC Veterinary Research* 2014; 10(1): 192.
9. A.D. Jourdan et al. Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66(9):3750-3755.
10. S.T. Lambertz et al. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74(19):6060-6067.
11. J. Liang et al. Two novel *ail*-positive biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica* isolated in China with unequal adhesion and invasion properties. *Infection, Genetics and Evolution* 2014;27:83-88.
12. A. Ub-Din et al. Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. *Brazilian Journal of Microbiology* 2014; 45(4): 1131-1138.
13. V. D. Thiem et al. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
14. W. S. Lin et al. A quantitative PCR assay for rapid detection of *Shigella* species in fresh produce. *Journal of Food Protection* 2010; 73(2): 221-233.
15. W. Mokhtari et al. Real-Time PCR using SYBR Green for the detection of *Shigella* spp. in food and stool samples. *Molecular and Cellular Probes* 2013, 27; 53-59.
16. S. Ghosh et al. Genetic characterization of *Shigella* spp. isolated from diarrhoeal and asymptomatic children. *Journal of Medical Microbiology* 2014, 63; 903-910.
17. J.J.R. Limor. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(7): 2335-2338.
18. S.E. Stroup et al. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probes. *Journal of Medical Microbiology* 2006; 55: 1217-1222.
19. S.J. Hadfield et al. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49(3): 918-924.
20. D.V. den Bossche et al. Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in feces. *Journal of microbiological methods* 2015; 110: 78-84.

21. R.D. Adam. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(3): 447-475.
22. J.J. Verweij et al. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and Cellular Probes* 2003; 17(5): 223-225.
23. R. Fotedar et al. PCR Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in Stool Samples from Sydney, Australia. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45 (3): 1035-1037.
24. R. Haque et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; 76(4): 713-717.
25. Y. Lau et al. Real-time PCR assay in differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* infections in Orang Asli settlements in Malaysia. *Parasites & Vectors* 2013; 6(1): 250.
26. C. Fuentes et al. Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water. *Food Microbiology* 2014; 40: 55-63.
27. T. Kageyama et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(4): 1548-1557.
28. N. Jothikumar et al. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(4): 1870-1875.
29. J. Vinjé. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 2015; 53(2): 373-381.
30. S. Mijatovic et al. Sensitive and Specific Quantitative Detection of Rotavirus A by One-Step Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay without Antecedent Double-Stranded-RNA Denaturation. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(9):3047-3054.
31. XL. Pang et al. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *Journal of Medical Virology* 2004; 72 (3): 496-501.
32. S Q Zeng. et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of virological methods* 2008; 153(2): 238-240.
33. I Wilhelmi et al. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and infection* 2003; 9: 247-262.
34. A Heim. et al. Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003; 70: 228–239.
35. N Jothikumar. et al. Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41. *Applied and environmental microbiology* 2005; 71: 3131–3136.
36. A Allard. et al. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(2): 498-505.
37. S. Guix et al. Human Astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects. *Letters in Applied Microbiology* 2005; 41 (2): 103-105.
38. 2. D. Sano et al. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environmental Science & Technology* 2010; 44(2): 808-812.
39. 3. A. Bosch et al. Human Astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2014; 27(4): 1048-1074.
40. M. Okada et al. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Archives of Virology* 2006; 151(12): 2503-2509.

41. 2. T. Oka et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 2006; 78(10): 1347-1353.
42. 3. M. Kitajima et al. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 2010; 76(8): 2461-2467.
43. 4. C. Logan et al. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *Journal of Virological Methods* 2007; 146(1-2): 36-44.
44. 5. F. Rovida et al. Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013; 77(3): 231-235.
45. 6. D. Sano et al. Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77(3): 1111-1114.
46. 7. P.J. Johansson. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2005; 37(3): 200-204.

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

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

Trademarks

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

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

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	22/02/2022
01	Actualización de formato. Se mejora la accesibilidad de los IFUs en diferentes idiomas. Corrección de errores tipográficos / Format update. The accessibility of IFUs in different languages is improved. Correction of typos.	08/06/2022

Table A 3. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 8th June 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 rev02