

VIASURE

Extraction Kit



Blood Pathogens

CE IVD



This instruction for use applies to the following references / *Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:*

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit, 96 prep	VS-EAB0196OP

Table A 1. References

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.

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.

ET IFUSi allalaadimiseks teistes keeltes külastage **certest.es/viasure/labeling**. Kui olete seal, järgige juhiseid, et saada juurdepääs vajalikule keelele. Kui vajate lisateavet, võtke palun ühendust: 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.

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.

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 purpose	5
2. Safety information	5
3. Summary and Explanation	6
4. Principle of the procedure	7
5. Reagents provided	8
6. Reagents and equipment to be supplied by the user	9
7. Transport and storage conditions	10
8. Warnings and Precautions	11
9. Test procedure	13
9.1. Sample collection, storage and transport	13
9.2. Sample pretreatment	14
9.3. Reagents' resuspension / preparation	14
9.3.1 Buffer's preparation	15
9.3.2 Proteinase K resuspension	15
9.3.3 Carrier resuspension	15
9.3.4 Lyophilized extraction control	15
9.3.5 Magnetics Beads	16
9.4. Extraction procedure	16
9.5 Real-Time PCR	19
10. Result interpretation	19
11. Limitations of the procedure	20
12. Quality control	20
13. Analytical performance characteristics	20
13.1 Analytical linearity	21
13.2 Analytical sensitivity. Limit of Detection (LoD)	21
13.3 Accuracy	22
13.3.1 Trueness (Veracity)	22
13.3.2 Precision	22
13.4 Analytical specificity	25
13.5 Metrological traceability	27
14. Clinical Performance characteristic	27
15. Troubleshooting	29

Contenido

1. Uso previsto	31
2. Información de seguridad	31
3. Introducción y explicación	32
4. Procedimiento	33

5. Reactivos suministrados	34
6. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario	35
7. Condiciones de transporte y almacenamiento.....	36
8. Advertencias y precauciones	37
9. Procedimiento del test	40
9.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	40
9.2. Pretratamiento de las muestras.....	41
9.3. Resuspensión / preparación de reactivos	41
9.3.1. Preparación de los Buffer	42
9.3.2. Resuspension de la Proteinasa K.....	42
9.3.3. Resuspensión del Carrier.....	42
9.3.4. Control de Extracción Liofolizado	43
9.3.5 Magnetic Beads	43
9.4. Procedimiento de extracción	43
9.5. PCR en tiempo real.....	47
10. Interpretación de los resultados.....	47
11. Limitaciones del procedimiento.....	47
12. Control de calidad	48
13. Características de funcionamiento analítico	48
13.1 Linealidad analítica	48
13.2. Sensibilidad analítica. Límite de Detección (LoD)	49
13.3. Exactitud.....	49
13.3.1. Veracidad.....	49
13.3.2. Precisión	50
13.4. Especificidad analítica	53
13.6. Trazabilidad metrológica.....	55
14. Características del funcionamiento clínico.....	55
15. Solución de problemas	56
Bibliography/Bibliografía	58
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	60
Trademarks	60

ENGLISH

1. Intended purpose

The VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit is designed for the isolation and purification of viral, bacterial and parasitic DNA and RNA from different clinical samples (whole blood, plasma, serum, blood culture, and cerebrospinal fluid) for subsequent diagnostic purposes using the automated extraction System. The kit contains different reagents to process clinical samples within automated platforms and facilitate the sensible detection of pathogens with real-time PCR (qPCR and RT-qPCR) assays. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

This Kit is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in molecular techniques and diagnostic procedures, and experience with potentially infectious human samples or materials.

2. Safety information

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit contains hazardous contents. For more information, please consult appropriate material safety data sheets (MSDS).

GSH classification




Reagent/Material	GHS symbol	Hazard phrases	Precaution phrases
Lysis Buffer	 Inflammable, corrosive and toxic	Danger H226, H302, H314, H412	P210, P260, P264, P280, P305+P351+P338, P310, P370+P378
Wash 1 Buffer	 Corrosive	Danger H314	P260, P264, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310, P501
Proteinase K	 Danger	Danger H315, H319, H334, H335	P261, P280, P284, P304+P340, P342+P311, P403+P233, P501

Table 1. GHS classification

Hazard phrases

H226; Flammable liquid and vapour.

H302; Harmful if swallowed.

H314; Causes severe skin burns and eye damage.

H315; Causes skin irritation.

H319; Causes serious eye irritation.

H334; May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.

H335; May cause respiratory irritation.

H412; Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Precaution phrases

P210; Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. - No smoking.

P260; Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray.

P261; Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.

P264; Wash hands thoroughly after handling.

P280; Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P284; [In case of inadequate ventilation] wear respiratory protection.

P304+340 IF INHALED; Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.

P305+P351+P338; IF IN EYES; Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P303+P361+P353; IF ON SKIN (or hair); Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water [or shower].

P310; Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

P370+P378; In case of fire: Use ... for extinction.

P501; Dispose of contents/container to ...

P342+P311; If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER or doctor/physician.

P403+P233; Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed.

3. Summary and Explanation

Samples from the bloodstream (serum, plasma and blood) and meninges (cerebrospinal fluid) can be matrices of interest in the diagnosis of infections. The presence of viruses, bacteria or parasites in these matrices may derive from dissemination of a localized infection, microbial growth in immunocompromised patients, contamination during surgical procedures or contact with infected body fluids, through vectors, or by the pathogenesis of the microorganism itself.

The diagnosis of all these microorganisms by conventional methods has great limitations. The detection of bacteremia and fungemia is of great diagnostic importance given the prognosis of mortality between 20% and 50% of cases. Conventional methodologies based on blood culture, identification of microorganisms and subsequent antibiotic sensitivity study are laborious techniques that require a minimum of 48-72 hours. As a therapeutic strategy, empirical treatment with broad-spectrum antibiotics is started until the causative agent of the infection is identified, which is the origin of antimicrobial resistance. In the case of viruses and parasites, culture is more laborious, and serology is usually used to evaluate their presence in blood, which is less sensitive.

Molecular diagnosis reduces time, is compatible with antibiotic treatment unlike cultures, allows the detection of resistance and therefore facilitates the correct selection of the antibiotic to be administered to the patient, and is automatable, easy to implement and has a good cost-effectiveness ratio.

Nevertheless, this technique requires a previous nucleic acid (NA) extraction. The procedure to do so includes three main steps: extracting or releasing the NA from the sample and the cell or organism by lysis; separating or isolating NA from other cellular or sample material; and purification by removal of inhibitory substances. A fourth optional step, concentrating, is important for detection of low-concentration analytes.

An extraction kit for the simultaneous isolation of high quality and quantity DNA and/or RNA, from different clinical samples, and pathogens, is essential for their specific detection through molecular diagnostic assays. Nowadays, the increased number of samples to be processed at clinical laboratories requires the possibility of automating this procedure. The adaptation of the reagents to a robotic platform can improve daily workflow, standardization of sample treatment, decrease variability, reduce biohazards, and avoid contamination by reducing the analyst final hands-on time.

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit is designed for the isolation and purification of viral, bacterial and parasitic DNA and RNA from different clinical samples (whole blood, plasma, serum, blood culture, and cerebrospinal fluid).

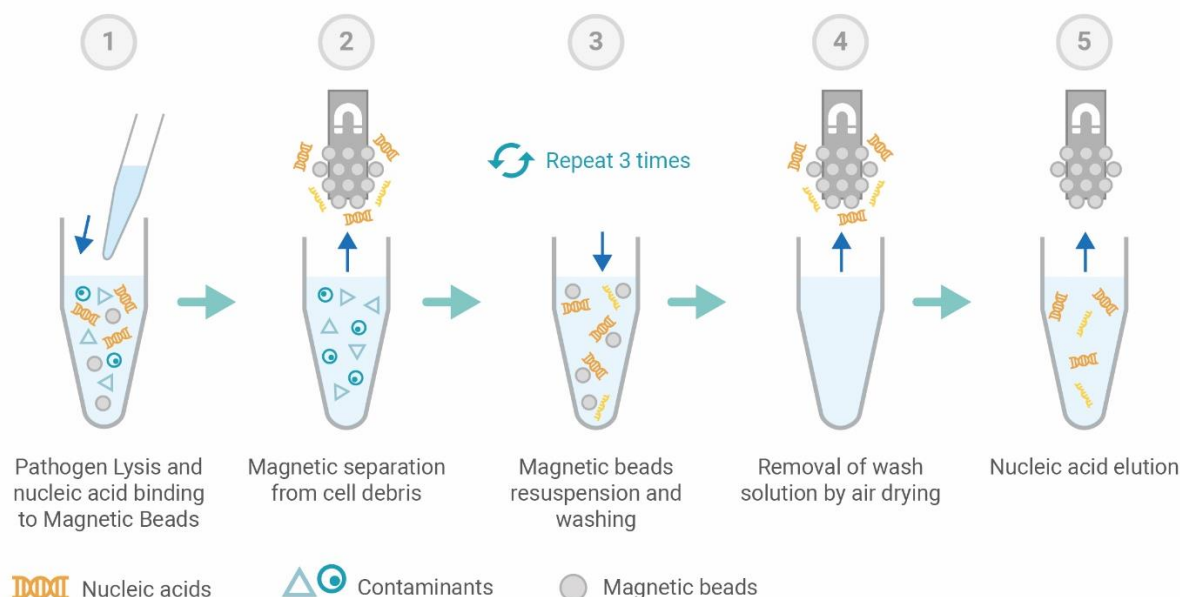
4. Principle of the procedure

The VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit procedure is based on the spontaneous and reversible adsorption of nucleic acids to superparamagnetic beads with a functionalized surface under appropriate buffer conditions. After some washing steps the nucleic acids are eluted in a purified and concentrated solution. The use of magnetic particles as solid phase for adherence of nucleic acids allows the processing of an elevated number of samples by their simultaneous exposition to a magnetic field, and therefore the automation of the process.

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit has been designed for the automatic platform KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™). This type of platform procedure transfers the magnetic beads between tube/wells from one reagent to the next, by magnetic field attraction. The activation and de-activation of the magnetic field allows beads attraction and beads resuspension within different buffers. Figure 1 shows the basic principle of this type of automated extraction. First, lysis is achieved by incubation with a Lysis Buffer containing chaotropic ions supported by Proteinase K digestion. Then, the Magnetic Beads and Carrier are added to the lysate, and, after the incubation, the adsorption of the nucleic acids occurs (1). The magnetic particles are attracted to the surface of a magnet covered with plastic tips (2), to be transferred to other wells containing Wash Buffer 1 and Wash Buffer 2 (2 times), to eliminate cell debris and salts. After three washing steps (3), beads are dried to eliminate organic solvent residues (4). Finally, the DNA and/or RNA is released from the magnetic particles with an elution buffer (5), which results in a pure sample ready

for quantification and analysis. Purified DNA and RNA can be directly used for downstream applications. It is highly recommended to use extraction controls, positive/negative controls, internal controls to evaluate the complete workflow (See Procedure sections).

Figure 1. Magnetic beads extraction basic principle for a Magnetic beads handling automated instrument.



VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit facilitates the simultaneous processing of different samples in the same extraction run, increases daily workflow, robustness and reproducibility, reduces contamination, and contact with biological hazards.

5. Reagents provided

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit includes the following reagents detailed in Table 2.

Reagent/Material	Description	Display	Amount
Lysis Buffer *	Liquid reagents mixture for pathogen lysis and nucleases inactivation	White bottle	1 bottle x 40 ml
Wash 1 Buffer *	Wash solution in which absolute ethanol (not included) must be added	White bottle	1 bottle x 30 ml
Wash 2 Buffer	Wash solution in which absolute ethanol (not included) must be added	White bottle	2 bottles x 20 ml
Elution Buffer	Solution for nucleic acid recovery	White bottle	1 bottle x 20 ml
Magnetic Beads	Magnetized beads suspension for nucleic acid adsorption	Transparent vial with blue cap	1 vial x 1.7 ml
Proteinase K	Enzyme solution for pathogen lysis in stabilized format	Transparent vial with cap	96 preps
Proteinase K Rehydration Buffer	Rehydration buffer for proteinase K vial resuspension	Transparent vial with yellow cap	1 vial x 1.9 ml
Carrier	Carrier for Nucleic Acid Precipitation Product	Transparent vial with orange cap	96 preps
Carrier Rehydration Buffer	Rehydration buffer for carrier vial resuspension	Transparent vial with purple cap	1 vial x 1.9 ml

Extraction control (EC)	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green vial with cap	1 vial
Water RNAse/DNAse Free	Rehydration buffer for Extraction Control vial resuspension	Transparent vial with transparent cap	1 vial x 1 ml

* Contains chaotropic salt. Not compatible with disinfectants containing bleach. See section 8 "Warning and precautions".

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit.

6. 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 Blood Pathogens Extraction Kit.

- Sample collection and transport system.
- Absolute ethanol.
- Micropipettes.
- Filter tips.
- Powder free disposable gloves.
- Biosafety cabinet.
- Pipettes and/or graduate test tube.
- Vortex.
- Thermomixer.
- Real-Time PCR instrument (thermocycler).
- Real-Time PCR assay.
- Ribonuclease (RNase)/ Deoxyribonuclease (DNase) free tubes for nucleic acid collection and storage.
- Positive and negative controls for the monitoring of the Extraction process. It is recommended the use of positive and negative extraction controls. (For example, VIASURE Viral Positive Control Kits).
- Sealing film for ELISA and general incubation for covering elution plate and storing nucleic acid. (Optional)

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit was tested and validated with the following workflow:

- Whole blood (diluted 1:2 in water), plasma, serum, blood culture, and cerebrospinal fluid samples + KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) + VIASURE Real Time PCR Detection Kits (Certest Biotec S.L) + VIASURE V-Lab96 Cyclor (Certest Biotec S.L).

Recommended consumables (Order the parts from your Official Distributor)

The recommended consumables required but not included in the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit when using the for the KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) system are listed below:

- KingFisher™ deep-well 96 plate - ThermoScientific™
- KingFisher™ 96 plate 200µL - ThermoScientific™
- KingFisher™ 96 tip comb for DW Magnets - ThermoScientific™

Note: In case that the consumable materials used differ from those recommended for this format, they must be validated by user.

7. Transport and storage conditions

- The kit reagents can be shipped at 15-30 °C until the expiration date which is stated on the kit label. Check all components for damages after receiving the kit. Do not use damaged kit components.
- Avoid vibrations during transport to prevent liquid leakage.
- It is recommended to keep Lysis Buffer, Wash 1 Buffer, Wash 2 Buffer, Elution Buffer, Proteinase K Rehydration Buffer, Carrier Rehydration Buffer, Extraction Control and Water RNase/DNase free vial at 15-30 °C away from light and heat sources and store in a vertical position to avoid any possible spillage.
- It is recommended to keep Magnetic Beads vials refrigerated at 2-8°C immediately after receiving the kit and for longer storage. It is recommended not to separate in aliquots.
- It is recommended to keep Proteinase K vials refrigerated at 2-8°C immediately after receiving the kit and until its resuspension. It is recommended not to separate in aliquots. Once re-suspended, keep them at -20°C avoiding freeze-thaw cycles (up to 6 times).
- It is recommended to keep Carrier vials refrigerated at 2-8°C immediately after receiving the kit and until its resuspension. It is recommended not to separate in aliquots. Once re-suspended, keep them at -20°C avoiding freeze-thaw cycles (up to 6 times).
- Once Extraction Control tube has been reconstituted use it immediately or store at -20°C until the expiration date stated on the kit label. It is recommended not to separate in aliquots. Keep it at -20°C avoiding freeze-thaw cycles (up to 6 times).
- Once the extraction has finished to ensure nucleic acid viability, keep eluates refrigerated at 4°C for up 8 hours until its addition to the different downstream applications. For long term storages eluates could be stored in the eluate plate covered with Sealing film for ELISA or transferred to a vial. It is recommended to store the supernatant obtained in the processing at 2-8°C for up to 8 hours and/or -20°C minimizing freeze-thaw cycles (up to 3 times).

The following table summarizes the conditions for transport, storage and use of the overall kit and each component:

Component	Transport Conditions	Storage Conditions	In-use conditions
Entire VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit	15-30°C during the shelf life stated in the kit label.	* See storage conditions of each component.	* See in-use conditions of each component.
Lysis Buffer		Store away from light and heat sources. Before use: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature.
Wash 1 Buffer		Store away from light and heat sources. Before use: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature
Wash 2 Buffer		Store away from light and heat sources. Before use: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature
Elution Buffer		Store away from light and heat sources. Before use: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature
Magnetic Beads		Store away from light and heat sources. Before use: 2-8°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-8°C during the shelf life stated in the kit label.	Immediate use at Room temperature.
Proteinase K		Store away from light and heat sources. Before use: 2-8°C during the shelf life stated in the kit label. Re-suspended component: store at -20°C during the shelf life stated in the kit label avoiding freeze-thaw cycles (up to 6 times).	Immediate use at Room temperature
Proteinase K Rehydration Buffer		Store away from light and heat sources. Before use: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature.
Carrier		Store away from light and heat sources. Before use: 2-8°C during the shelf life stated in the kit label. Re-suspended component: store at -20°C during the shelf life stated in the kit label avoiding freeze-thaw cycles (up to 6 times).	Immediate use at Room temperature
Carrier Rehydration Buffer		Store away from light and heat sources. Before use: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature.

Extraction Control		Store away from light and heat sources. Before use: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label. Rehydrated control: use it immediately or store at -20°C until the expiration date stated on the kit label avoiding freeze-thaw cycles (up to 6 times).	Immediate use at Room temperature.
Water RNase/DNase free vial		Store away from light and heat sources. Before use: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 15-30°C during the shelf life stated in the kit label	Room temperature.

Table 2. Summary of the conditions for transport, storage, and use of the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and each component.

8. Warnings and Precautions

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of nucleic acid extraction procedures and real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures, including training on nucleic acid extraction system and the real-time PCR instrument (thermocycler).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Instructions for use of the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit must be read carefully before using the product. Do not perform the assay until the information about procedures, safety precautions and limitations described in the Instructions for use have been understood.
- 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 external box or the protective pouches are opened or damaged upon arrival.
- Do not use Extraction Control if desiccant is not present or broken inside reagent pouch. Do not remove desiccant from reagent pouch once is open.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity and sunlight. Prolonged exposure to humidity and sunlight may affect product performance.
- 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. In cases where other extraction procedures are performed in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and any additional reagents or equipment required for testing are not contaminated.
- Design a unidirectional workflow. Do not reuse reagents and do not recover the remaining liquid volume into the original bottle of the reagent once used.
- Do not reuse any disposable items. Do not refill bottles once empty due to possible contamination between reagents could affect the sensibility of the workflow.
- Use screw-capped tubes and prevent any potential splashing or cross contamination of specimens during preparation.
- After the first use, once the bottles or the tubes have been opened, close each bottle/tube with the bottle caps/tubes caps supplied to store them. Mark each bottle cap/tube cap with an indelible marker. Do not mix the bottle cap from one bottle to the bottle cap from another bottle. Do not mix the tubes caps from one tube to another component tube cap.
- Do not mix tubes from VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit with those from VIASURE Real Time PCR Detection Kit. Please consult section 9.3.4 Lyophilized extraction control.
- Avoid possible contamination of reagents with extracted nucleic acids, PCR products, and positive control. To prevent contamination of reagents, use of filter-tips is recommended.

- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles, and mask. Do not eat, drink or smoke or apply cosmetic products in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- 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, state, and federal regulations.
- All reagents should be handled with care, minimizing the time of exposure to the open, especially those reconstituted with absolute ethanol.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Reliability of the results depends on adequate specimen collection, storage, transport, and processing procedure.
- Use graduated test tubes to fill the bottles with ethanol.
- In the case of a subsequent qPCR analysis, consult each qPCR kit or real-time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions, and procedures.
- Lysis Buffer and Wash 1 Buffer contain chaotropic salt. Not compatible with disinfectants containing bleach. Consult the hazards and precautions when handling Lysis Buffer and Wash 1 Buffer in the Material Safety Data Sheets provided with the Device.
- Make sure there is not precipitate in the supplied reagents. Lysis Buffer and Wash 1 Buffer contain guanidine salts that may precipitate. If there is visible precipitate at the bottom of the bottle, resuspend by mild heating and shake until its complete dissolution.
- Make sure that the Magnetic Beads and Carrier are completely resuspended. Shake vigorously the stored vial on a Vortex.
- Proteinase K could precipitate after freeze-thaw cycles. Make sure that Proteinase K is completely resuspended. Shake vigorously the storage vial on a Vortex.
- Before dispensing VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit into the platform consumables open carefully each well avoiding reagent spilling and reconstitute the indicated wells as indicated in the procedure section.
- Make sure all tubes or plates have been properly placed following the indicated layout and fit correctly into the specific adapters of the Automated extraction system.
- The waste generated with the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit has not been tested for residual infectious material. A contamination of the liquid waste with residual infectious material is highly unlikely due to strong denaturing Lysis Buffer and Proteinase K treatment but it cannot be excluded completely. Therefore, liquid waste must be considered infectious and should be handled and discarded according to local safety regulations.
- The handling of substances and the disposal of waste may be subject to local, state, or federal law, or to regulations regarding health, environment, or safety. Strictly observe the corresponding provisions. Consult appropriate material safety data sheets (MSDS) for more information.

9. Test procedure

9.1. Sample collection, storage and transport

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit is suitable for various potentially infectious clinical samples: whole blood, plasma, serum, blood culture, and cerebrospinal fluid. For reproducible and high yields appropriate sample storage is essential. Yields may vary from sample to sample depending on factors such as health and age of the donor, kind of sample, collection date, transport, and storage conditions. **Whole blood (diluted 1:2 in water)** and **plasma samples** collected in EDTA (S-Monovette® K3 EDTA, 2.7 ml (Starstedt)), Citrate (S-Monovette® Citrate 3ml 9NC, (Starstedt)), Heparine (S-Monovette® Citrate 3ml 9NC, (Starstedt)), Reveos® LR Set CPD/SAG-M Blood Bag Set with RBC leukoreduction filter (TERUMOBCT), Reveos Automated Blood Processing System, anticoagulant citrate phosphate dextrose (CPD); **serum samples** collected in Clot activator polymer (S-Monovette® Serum Z-Gel, clotting activator/gel, 7.5 ml, cap brown (Starstedt)) and Human serum (Merk); and **blood culture** collected in BD BACTECT™ Plus Aerobic medium in plastic culture vials and BD BACTECT™ Lytic Anaerobic medium in plastic culture vials.

Heparin is a well-known RT-PCR inhibitor, therefore, is recommendable to avoid heparin collection tubes.

As general recommendations, the specimens should be collected as soon as possible, depending on the pathogen during the acute phase of illness or at any time during the clinical course, and before antimicrobial therapy begin, if possible. Specimens should be collected in a sterile container avoiding touching adjacent tissues and organ secretions that are not of interest. All specimens must be labeled with the name and identification number of the person from whom the sample was collected, the source of the specimen, and the date and time it was collected. After collection, specimens should be placed in a biohazard bag and transported to the laboratory as soon as possible.

Depending on the type of specimen, the collection differs. Follow the recommendations by McPherson R.A., Pincus M.R. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 23RD edition. Elsevier Health Sciences; 2017.

According to the literature, the conditions of transport, storage and stability depend on the type of the sample matrix and the pathogen to be detected. It is recommended to use fresh specimens for the test. The specimens should be held at room temperature for cerebrospinal fluid (CSF), blood and other body fluids. If a delay is unavoidable (< 2 hours until they can be sent), the general rule is to ship at -20°C or ideally at -70°C or - 80°C.

Optimally, all specimen containers should be opened in a biological safety cabinet. Appropriate barriers should be used to prevent exposure of skin and mucous membranes to the specimen. Gloves and a lab coat must always be worn when handling patient specimens. Masks, goggles (or working behind a plastic shield), and impermeable gowns or aprons must be worn when there is a risk for splashes or droplet formation. Wash your hands once the procedure has finished.

Specimens submitted for molecular testing must be stored in controlled conditions so that nucleic acids do not degrade during storage. Avoid freezing and thawing cycles. Some pathogens from specimens that are frozen and then thawed could be degraded and may result in false-negative test results.

Depending on the clinical specimen and pathogen different sample pretreatments may be needed. Follow the appropriate protocol laboratory guideline in each case.

For Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens consult: 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).

9.2. Sample pretreatment

Depending on the clinical specimen and pathogen different sample pretreatments may be needed. It is important to avoid substances or objects that may interfere in sample pipetting during the automated process, therefore, caps or swabs should be removed before introducing the samples into the sample racks, and solid or highly viscous samples must be pretreated.

- Blood culture: Follow manufacturer instructions for use for microorganism growth. After incubation, transfer supernatant to a vial/tube.
- Whole blood: this matrix must be diluted 1/2 in DNase/RNase free water for performance in molecular biology applications.

The rest of validated samples can be directly introduced into the platform.

9.3. Reagents' resuspension / preparation

Please, carefully read each reagents preparation or resuspension sections to be aware of all the precautions and recommendations it should be taken.

Before starting with the nucleic acid extraction and purification, it is necessary in some reagents to add a certain volume of other reagents (some of them are not included in the kit). The following table indicates which reagent should be added and the required volume:

Reagent/Material	Reagent for resuspension / preparation	Volume
Wash 1 Buffer	Absolute ethanol	70 mL
Wash 2 Buffer (I)	Absolute ethanol	80 mL
Wash 2 Buffer (II)	Absolute ethanol	80 mL
Proteinase K	Proteinase K Rehydration Buffer	1.7 mL
Carrier	Carrier Rehydration Buffer	1.7 mL
Extraction Control	Water RNase/DNase Free	1 mL
Magnetic Beads	-	-

Table 3. Reagents and volumes to be resuspended/prepared in the Reagents.

After the first use, once the bottles or the tubes have been opened, close each bottle/tube with the bottle caps/tubes caps supplied to store them. Mark each bottle cap/tube cap with an indelible marker. Do not mix the bottle cap from one bottle to the bottle cap from another bottle. Do not mix the tubes caps from one tube to another component tube cap. Do not mix tubes from VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit with those from VIASURE Real Time PCR Detection Kit.

9.3.1 Buffer's preparation

Lysis Buffer and Wash 1 Buffer contain guanidine salts that may precipitate. If there is visible precipitate at the bottom of the bottle, resuspend by mild heating and shake until its complete dissolution before open the bottles for the first use. In the following uses, ensure the correct closure with the bottle cap before doing this step.

Before starting with the nucleic acid extraction and purification, it is necessary in some reagents to add a certain volume of other reagents (not included in the kit). The following table indicates which reagent should be added and the required volume:

Reagent/Material	Reagent for preparation	Volume
Wash 1 Buffer*	Absolute ethanol	70 mL
Wash 2 Buffer (I)*	Absolute ethanol	80 mL
Wash 2 Buffer (II)*	Absolute ethanol	80 mL

Table 4. Reagents and volumes to be added to the Wash 1 Buffer and Wash 2 Buffer.

**Note: To facilitate the process, a mark has been included on the label of each reagent to tick when the reagents are added.*

Besides, it is recommended to make sure to write with indelible marker the specific automated extraction system bottles used once prepared in the space with the resuspension date and other required information.

Use graduated test tubes to fill the bottles with absolute ethanol.

9.3.2 Proteinase K resuspension

Before starting with the nucleic acid extraction and purification, it is necessary to resuspend Proteinase K (Transparent vial with cap) with 1.7 mL of Proteinase K Rehydration Buffer (Transparent vial with yellow cap) included in the kit.

It is recommended to keep Proteinase K vials refrigerated at 2-8°C immediately after receiving the kit and once resuspended keep at -20°C avoiding freeze-thaw cycles (up to 6 times).

9.3.3 Carrier resuspension

Before starting with the nucleic acid extraction and purification, it is necessary to resuspend Carrier (Transparent vial with orange cap) with 1.7 mL of Carrier Rehydration Buffer (Transparent vial with purple cap) included in the kit. Make sure that the Carrier are completely resuspended. Shake vigorously the storage vial on a Vortex.

It is recommended to keep Carrier vials refrigerated at 2-8°C immediately after receiving the kit and once resuspended, keep at -20°C avoiding freeze-thaw cycles (up to 6 times).

9.3.4 Lyophilized extraction control

The use of the Extraction Control (EC) will be required only for VIASURE Real Time PCR products which do not include an internal control in the lyophilized reaction mix. Please consult Instructions for use of each VIASURE Real Time PCR products to check this information. For these VIASURE Real Time PCR products use the Extraction Control (EC) provided in the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit.

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the PCR-Amplification area. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) adding 1 mL of Water RNase/DNase free (Transparent vial with transparent cap) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C and minimize freeze and thaw cycles (up to 6 cycles).

Note 1: Add 5 µL of the rehydrated EC to the mixture sample and Lysis Buffer to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Note 2: Because of the nature of extraction control synthesis or production do not use the Extraction Control (EC) included in this kit (VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit) on samples to be analyzed by qPCR for *E.Coli* and/or *TEM* gene (β-lactamases resistance) detection. In this case, please use the Extraction Control (EC) vial included in the VIASURE Real Time PCR Detection Kit.

9.3.5 Magnetics Beads

Before starting with the nucleic acid extraction and purification, make sure that the magnetic beads are completely resuspended. Shake vigorously the storage vial on a Vortex. Magnetic Beads are included in a 1.7 mL Transparent vial with blue cap.

It is recommended to keep Magnetic Beads vials refrigerated at 2-8°C immediately after receiving the kit.

9.4. Extraction procedure

The procedure below provides instructions on the steps to process samples. Refer to the KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) user manual for instructions on how to use the platform and the extraction procedure to follow within KingFisher® Flex automatic platforms. *(Note: In case of using VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit with another automated extraction system different from the one mentioned in these Instructions for use, the procedure must be validated by the user).*

1. Load with reagents 96 Deep well plates

Load the following five plates with the reagents and volumes in the required wells depending on the number of samples to analyze.

- a. Sample Plate: Lysis Buffer 300 µl, sample 200 µl, rehydrated Extraction Control 5 µl (optional), Proteinase K 15 µl, Magnetic Beads 15 µl and Carrier 15 µl.
- b. Wash 1 Plate: Wash 1 Buffer 800 µl.
- c. Wash 2 (I) Plate: Wash 2 Buffer 800 µl.
- d. Wash 2 (II) Plate: Wash 2 Buffer 800 µl.
- e. Elution Plate: Elution Buffer 100 µl.

Note: It is recommended to identify/mark each plate. Pipette each component separately to avoid possible contamination and to ensure the correct functionality of the reagents.

2. Set Up the instrument.

Start the instrument

Select the Blood_Pathogens Extraction protocol using the cursor keys and press START or use BindIt Software to run the desired protocol via the PC. If not created, please follow the instructions below and create it with BindIt Software.

1. Define a plate Layout (enter name and reagents information as described in 1 Load with reagents 96 Deep well plates).
2. Configure the protocol adding the steps described in the table below:

Step name	Procedure	Setting
Pick Up	96 Tip plate	
Lysis and Binding	Sample plate	
Beginning of step	Precollect	No
	Release beads	Yes
Mixing/Heating parameters	Mixing time (hh:mm:ss), speed	00:10:00, Fast
	Heating during mixing	Yes
	Block temperature (°C)	65
	Preheat	Yes
End of step	Postmix	No
	Collect beads, count	5
	Collect time (s)	0
Collect Beads	Sample plate	
	Collect count	5
	Collect time (s)	4
Wash 1	Wash 1 plate	
Beginning of step	Precollect	No
	Release beads (hh:mm:ss), speed	00:00:20, Bottom mix
Mixing/Heating parameters	First mix time (hh:mm:ss), speed	00:00:20, Bottom mix
	Second mix time (hh:mm:ss), speed	00:00:20, Fast
	Loop count	3
	Heating during mixing	No
End of step	Postmix	No
	Collect beads, count	5
	Collect time (s)	3
Wash 2 (I)	Wash 2 (I) plate	
Beginning of step	Precollect	No
	Release beads (hh:mm:ss), speed	00:00:20, Fast
Mixing/Heating parameters	First mix time (hh:mm:ss), speed	00:00:10, Bottom mix
	Second mix time (hh:mm:ss), speed	00:00:20, Fast
	Loop count	3
	Heating during mixing	No

End of step	Postmix	No
	Collect beads, count	4
	Collect time (s)	2
Wash 2 (II)	Wash 2 (II) plate	
Beginning of step	Precollect	No
	Release beads (hh:mm:ss), speed	00:00:20, Fast
Mixing/heating parameters	First mix time (hh:mm:ss), speed	00:00:10, Bottom mix
	Second mix time (hh:mm:ss), speed	00:00:20, Fast
	Loop count	3
	Heating during mixing	No
End of step	Postmix	No
	Collect beads, count	4
	Collect time (s)	2
Dry	Wash 2 (II) plate	
	Dry time (hh:mm:ss)	00:02:00
	Tip position	Outside well/tube
Elution	Elution Plate	
Beginning of step	Precollect	No
	Release beads (hh:mm:ss)	Yes, 00:00:00
Mixing/Heating parameters	First mix time (hh:mm:ss), speed	00:00:20, Bottom mix
	Second mix time (hh:mm:ss), speed	00:00:45, Medium
	Loop count	6
	Heating during mixing	Yes
	Block temperature (°C)	75
	Preheat	Yes
End of step	Postmix	No
	Collect beads, count	5
	Collect time (s)	2
Collection beads	Elution plate	
Beginning of step	Precollect	No
	Release beads	No
Mixing/Heating parameters	Mixing time (hh:mm:ss), speed	00:02:00, Slow
End of step	Collect beads	No
Leave	Tip plate	

Table 4. Complete settings of the extraction process to be followed within KingFisher® Flex automatic platforms.

3. Plate Set Up into the instrument.

Please follow the instrument graphical interface and fill the platform with the plates following the next order:

Note. Make sure all plates are loaded in the same direction, with the well A1 facing the top right.

- 1st. Tip plate (KingFisher™ 96 plate 200µL - ThermoScientific™ + KingFisher™ 96 tip comb for DW Magnets - ThermoScientific™).
- 2nd. Elution plate.
- 3rd. Wash 2 (II) Buffer plate.
- 4th. Wash 2 (I) Buffer plate.
- 5th. Wash 1 Buffer plate.
- 6th. Sample plate.

Once plates have been loaded click start and the run will be done in 38 minutes.

4. Purified nucleic acids recovery

Once the extraction has finished to ensure nucleic acid viability, keep eluates refrigerated at 4°C for up to 8 hours until its addition to the different downstream applications. For long term storages eluates could be stored in the eluate plate covered with Sealing film for ELISA or transferred to a vial. It is recommended to store the supernatant obtained in the processing at 2-8°C for up to 8 hours and/or -20°C minimizing freeze-thaw cycles (up to 3 times).

Once the extraction and PCR setup transfer the loaded plate to thermocycler for nucleic acid amplification following Manufacturer's indications.

5. Decontamination

Decontaminate properly the platform inner surfaces with appropriate disinfectant solvents and discard used plastic consumables.

For more details consult KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) user manual.

9.5 Real-Time PCR

The nucleic acids obtained with VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit are compatible with any commercially available qPCR or RT-qPCR kit, although it has only been validated with the VIASURE Real Time PCR Detection kits.

Manufacturer's instructions of the VIASURE Real Time PCR Detection Kits must be followed (<https://www.certest.es/es/viasure/>). The positive and negative controls included in the extraction step must not substitute the positive and negative controls provided with the qPCR kits.

Recommendation is to use the thermocycler VIASURE V-Lab96 Cyclor (Certest Biotec S.L) for the analysis and interpretation of the results.

10. Result interpretation

To correctly interpret the results of the controls and clinical samples, please consult the Manufacturer's Instructions of the different downstream applications.

11. Limitations of the procedure

- The efficiency of the performance characteristics of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit for KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) depends on the specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods and the efficiency of the flowchart used by each laboratory: qPCR assay and thermocycler. Each complete procedure, different from the one mentioned in these Instructions for use, must be validated by the end user.
- For appropriate yield and quantity, sample collection, storage, and pre-treatment must be performed following the specific recommendations of official laboratory guidelines.
- If the consumable materials used differ from those recommended for this format, they must be validated by user.
- VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit can be automated in the automated platform KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™). Be sure to read this Instruction Manual and the KingFisher™ Flex's User Manual carefully before use. If the automation is performed in a different magnetic bead handling platform with other consumables, it must be validated by user.
- Bottles should be stored at 15-30 °C away from light and heat sources and store in a vertical position to avoid any possible spillage, Magnetic Beads refrigerated at 2-8°C and Proteinase K, Carrier and the Extraction Control stored at -20°C (up to 6 freeze-thaw cycles). It is also important to check the storage conditions of the components once the kit has been opened. Please consult section 7 of the instructions for use of the kit.
- Because of the nature of extraction control synthesis or production do not use the Extraction Control (EC) included in this kit (VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit) on samples to be analyzed by qPCR for *E.Coli* and/or *TEM* gene (β -lactamases resistance) detection. In this case, please use the Extraction Control (EC) vial included in the VIASURE Real Time PCR Detection Kit.
- Whole blood must be diluted 1:2 in water due to a correct sample pretreatment. If whole blood is not diluted, it could affect instrument pipetting.
- Heparin is a well-known RT-PCR inhibitor, therefore, is recommendable to avoid heparin collection tubes. (As anticoagulant or collection tubes).

12. Quality control

The expected values of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit depend on the diagnostic procedure (extraction and qPCR assay), so each complete procedure must be validated by the final user.

It is recommended to use the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit in conjunction with appropriate controls to monitor the entire process for different downstream applications. To control the complete process, from sample processing to analysis, perform the following controls: Positive Control (not provided), Negative Control (not provided) and Extraction Control (provided with the kit).

13. Analytical performance characteristics

The target models chosen for the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit design, optimization and validation procedure should generate the maximum number of different specimen types, so that each target model is

associated with a specimen type. These target models have been chosen based on the following criteria: clinical frequency, commercial sales of VIASURE qPCR products, difficulty in lysis, NA target, and NA size.

13.1 Analytical linearity

The linearity of the assay was determined by testing specific dilutions of each validated pathogen in different biological matrix using certified reference strain as shows the table below.

Pathogen	Reference strain	Matrix	Linearity range
Zika Virus	1st WHO International Standard for Zika Virus RNA (PEI code: 11468/16)	Serum	$1 \times 10^4 - 1.1 \text{ IU}/\mu\text{l}$
		Whole blood	$1 \times 10^4 - 1.1 \text{ IU}/\mu\text{l}$
<i>Plasmodium falciparum</i>	1st WHO International Standard for Plasmodium falciparum DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 04/176)	Whole blood	$5 \times 10^4 - 5 \text{ IU}/\mu\text{l}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® BAA-2146™)	Aerobic blood culture	$5 \times 10^1 - 5 \times 10^{-3} \text{ CFU}/\mu\text{l}$
		Anaerobic blood culture	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^{-2} \text{ CFU}/\mu\text{l}$
<i>Cytomegalovirus</i>	1st World Health Organization Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic acid Amplification techniques (NIBSC code: 09/162)	Plasma	$1 \times 10^2 - 1 \text{ IU}/\mu\text{l}$

Table 5. Linearity.

In conclusion, all real-time PCR assays showed an acceptable efficiency and linearity, (R^2) were >0.9 in all the target reactions tested.

13.2 Analytical sensitivity. Limit of Detection (LoD)

Analytical sensitivity or limit of detection (LoD) was determined based on the LoD obtained in the (RT)-qPCR assay used for the validation procedure. Samples were extracted with VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit in the KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) and analyzed with the thermocycler VIASURE V-Lab96 Cyclor (Certest Biotec S.L).

The results obtained showed that the LoD are the following for the chosen model pathogens, with a positive rate of 95%:

Pathogen	Reference strain	Matrix	LOD
Zika Virus	1st WHO International Standard for Zika Virus RNA (PEI code: 11468/16)	Serum	$0.5 \text{ IU}/\mu\text{l}$
		Plasma	$1 \text{ IU}/\mu\text{l}$
		Whole blood	$0.5 \text{ IU}/\mu\text{l}$
<i>Plasmodium falciparum</i>	1st WHO International Standard for Plasmodium falciparum DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 04/176)	Whole blood	$5 \text{ IU}/\mu\text{l}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® BAA-2146™)	Aerobic blood culture	$0.005 \text{ CFU}/\mu\text{l}$
		Anaerobic blood culture	$0.01 \text{ CFU}/\mu\text{l}$
<i>Cytomegalovirus</i>	1st World Health Organization Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic acid Amplification techniques (NIBSC code: 09/162)	Plasma	$1 \text{ IU}/\mu\text{l}$
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (ATCC®13091™)	CSF	$2 \text{ CFU}/\mu\text{l}$

Table 6. Limit of Detection (LoD).

13.3 Accuracy

13.3.1 Trueness (Veracity)

The veracity of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit was evaluated with reference material listed below.

Reference strains: the validity of obtained results during the product validation has been verified using different reference strains for each pathogen. Strains used:

- **The American Type Culture Collection ("ATCC®").**
 - *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® BAA-2146™)
 - *Neisseria meningitidis* (ATCC®13091™)
 - Mumps Virus (ATCC®VR-106™)
- **National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).**
 - 1st WHO International Standard for Plasmodium falciparum DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 04/176).
 - 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic acid Amplification techniques (NIBSC code: 09/162).
 - 1st WHO International Standard for HHV -6B virus DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 15/266).
 - 1st WHO International Standard for BK virus DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 14/212).
- **The Paul-Ehrlich-Institut (PEI).**
 - 1st WHO International Standard for Zika Virus RNA (PEI code: 11468/16).
 - 1st WHO International Standard for Chikungunya virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (PEI code: 11785/16).
 - PEI Reference Preparation WNV Lineage 1 RNA (#13299/19).
- **bei RESOURCES.**
 - Dengue virus type 1 (DEN-1) strain Hawaii (bei RESOURCES Ref: NR-82 (derived from ATCC® VR-1254™).
 - *Leishmania donovani* strain 1S (MHOM/SD/62/1S) (bei RESOURCES Ref: NR-48821).

13.3.2 Precision

To determine the precision of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit, intra-assay (repeatability), inter-assay (reproducibility), inter-batch (intermediate precision) and inter-thermocycler (site-to-site) assays were performed. The panel of samples were analyzed following the workflow VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit using the KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™), VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit and VIASURE V-Lab96 Cycler (Certest Biotec S.L).

Intra-assay. Repeatability

The repeatability was tested by analyzing replicates all samples will be tested up to twelve replicates in one day using VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and the selected workflow. The following tables shows the results obtained in this assay.

Sample	Target	Viasure channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive 1 (2-3xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	32.61	0.46	1.41
Positive 2 (10xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	31.14	0.40	1.28
Negative sample	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Extraction Control	HEX	21.44	0.34	1.57

Table 7. LoD. Intra-assay repeatability of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. (\bar{x}) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Sample	Target	Viasure channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive 1 (2-3xLoD)	Zika Virus	FAM	34.93	1.06	3.04
Positive 2 (10xLoD)	Zika Virus	FAM	33.29	0.43	1.29
Negative sample	Zika Virus	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Extraction Control	HEX	19.70	0.15	0.75

Table 8. Intra-assay repeatability of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and VIASURE *Zika Virus* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. (\bar{x}) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-assay. Reproducibility

The reproducibility was tested by analyzing the different samples on three different days by three different operators with the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and the selected workflow. A summary of results is shown in the tables below.

Sample	Target	Viasure channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive 1 (2-3xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	33.89	1.09	3.22
Positive 2 (10xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	32.57	1.09	3.34
Negative sample	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Extraction Control	HEX	22.54	1.75	7.76

Table 9. Inter-assay reproducibility of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. (\bar{x}) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Sample	Target	Viasure channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive 1 (2-3xLoD)	Zika Virus	FAM	34.00	1.07	3.14
Positive 2 (10xLoD)	Zika Virus	FAM	32.49	0.62	1.92
Negative sample	Zika Virus	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Extraction Control	HEX	22.17	1.67	7.55

Table 10. Inter-assay reproducibility of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. (\bar{x}) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-batch. Intermediate precision

The inter-batch values were determined with three replicates of the different samples by using three batches of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and the selected workflow. The results are described in the following tables.

Sample	Target	Viasure channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive 1 (2-3xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	34.21	0.48	1.41
Positive 2 (10xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	31.95	0.42	1.32
Negative sample	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Extraction Control	HEX	23.67	0.33	1.39

Table 11. Inter-batch Intermediate precision of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. (\bar{x}) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Sample	Target	Viasure channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive 1 (2-3xLoD)	Zika Virus	FAM	34.42	1.50	4.37
Positive 2 (10xLoD)	Zika Virus	FAM	32.48	0.74	2.29
Negative sample	Zika Virus	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Extraction Control	HEX	20.78	1.04	4.99

Table 12. Inter-batch Intermediate precision of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. (\bar{x}) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Site-to-site. Inter-thermocycler

The inter-thermocycler values were determined with three replicates of the same samples used for intra-assay, inter-assay and inter-batch, using the VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit, VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit and VIASURE *Zika Virus* Real Time PCR Detection Kit in the thermocyclers CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), VIASURE V-Lab96 Cycler (Certest Biotec S.L.) and QuantGene 9600 qPCR equipment (BIOER). The results are described in the following tables.

Sample	Target	Viasure channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive 1 (2-3xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	37.06	1.00	2.69
Positive 2 (10xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	34.10	3.85	11.30
Negative sample	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Extraction Control	HEX	22.15	1.02	4.63

Table 13. Inter-thermocycler of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit. ((Ct) = threshold cycle. (\bar{x}) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Sample	Target	Viasure channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive 1 (2-3xLoD)	Zika Virus	FAM	35.71	1.31	3.66
Positive 2 (10xLoD)	Zika Virus	FAM	32.55	0.83	2.56
Negative sample	Zika Virus	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Extraction Control	HEX	22.56	1.89	8.37

Table 14. Inter-thermocycler of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit and VIASURE *Zika Virus* Real Time PCR Detection Kit. ((Ct) = threshold cycle. (\bar{x}) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

13.4 Analytical specificity

Interferences and inhibitors

An interfering substance study was performed to test the possible interfering effect of endogenous and exogenous substances on VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit using VIASURE Real Time PCR Detection Kits in the thermocycler VIASURE V-Lab96 Cycler (Certest Biotec S.L.). A total of 27 (for whole blood and serum) and 20 (for plasma) potentially interfering substances were evaluated.

Evaluation of the interference in the whole process (extraction and the (RT)-qPCR)

The following results were obtained in the analysis in whole blood (diluted 1:2 in water).and serum samples:

Substance Name	Concentration tested	Result
Zinc / Zinc sulphate	1.20E-02 mg/ml	N.I
Acetylsalicylic Acid	3.00E-02 mg/ml	N.I
Ibuprofen	2.19E-01 mg/ml	N.I
Chloroquine sulphate/phosphate	6.00E-01 mg/ml	N.I
Acyclovir	6.60E-02 mg/ml	N.I
Foscarnet	7.00E-01 mg/ml	N.I
Oseltamivir	3.99E-04 mg/ml	N.I
Ampicillin	7.50E-02 mg/ml	N.I
Ceftriaxone	8.40E-01 mg/ml	N.I
Doxycycline hyclate	1.80E-02 mg/ml	N.I
Metronidazole	1.23E-01 mg/ml	N.I
Vancomycin	1.20E-01 mg/ml	N.I
EDTA	9.90E-04 mg/ml	N.I
Heparin	3.30E+00 units/ml	N.I
Lorazepam	7.20E-04 mg/ml	N.I
Albumin	1.00E+01 mg/ml	N.I
Bilirubin	4.00E-01 mg/ml	N.I
Genomic DNA	3.50E-03 mg/ml	N.I
Glucose	1.00E+01 mg/ml	N.I
Human Hemoglobine	1.00E+01 mg/ml	N.I
Immunoglobulin G	2.00E+01 mg/ml	N.I
Lactate	9.00E-01 mg/ml	N.I
Leukocytes	6.25E+06 cell/ml	N.I
Triglycerides	1.50E+01 mg/ml	N.I
4-Acetamidophenol	1.56E-01 mg/ml	N.I
Dexamethasone	1.20E-02 mg/ml	N.I
Omeprazole	8.40E-03 mg/ml	N.I

Table 15. Potential interference substances. N.I: No reportable interfere.

The following results were obtained in the analysis in plasma samples:

Substance Name	Concentration tested	Result
Acetylsalicylic Acid	3.00E-02 mg/ml	N.I
Ibuprofen	2.19E-01 mg/ml	N.I
Naproxen	3.60E-01 mg/ml	N.I
Cidofovir	8.10E-02 mg/ml	N.I
Foscarnet	7.00E-01 mg/ml	N.I
Ganciclovir	3.20E-02 mg/ml	N.I
Valganciclovir	2.20E-02 mg/ml	N.I
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	9.90E-04 mg/ml	N.I
Heparin	3.30E+00 units/ml	N.I
	7.50E-09 mg/ml	N.I
Doxycycline hyclate	1.00E+01 mg/ml*	N.I
17- α -Ethinylestradiol	4.00E-01 mg/ml	N.I
Albumin	3.50E-03 mg/ml	N.I

Bilirubin	1.00E+01 mg/ml	N.I
Genomic DNA	1.50E+01 mg/ml	N.I
Human hemoglobine	2.58E-03 mg/ml	N.I
Triglycerides	1.13E+00 mg/ml	N.I
Azathioprine	4.20E-02 mg/ml	N.I
Ciclosporin	9.90E-05 mg/ml	N.I
Mycophenolate mofetil	1.56E-01 mg/ml	N.I
Prednisone	3.00E-02 mg/ml	N.I
4-Acetamidophenol	2.19E-01 mg/ml	N.I

Table 16. Potential interference substances. N.I: No reportable interfere.

In conclusion, different potentially interfering substances have been tested in whole blood (1:2 diluted), serum and plasma. Thus, no interference of any of the evaluated substances was observed at the concentrations indicated for each workflow.

13.5 Metrological traceability

This assay is not designed for measuring purposes.

14. Clinical Performance characteristic

In order to determine the clinical diagnostic accuracy, several evaluations with different clinical sample matrix were conducted at Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Spain) through collaboration with national entities.

The clinical performance of VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit using the KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) was tested using clinical spiked samples (79 whole blood, 87 serums, and 82 plasma) and with 26 blood culture of patients with suspected bacteraemia. For the evaluation using contrived samples, the following strains were used to generate at least n= 30 spiked samples at 2x LoD, n=10 at 5x LoD, n=10 at 10x LoD of *Plasmodium falciparum* (NIBSC code: 04/176), Zika Virus (PEI code: 11468/16) and Human Cytomegalovirus (NIBSC code: 09/162), each one in the appropriate clinical matrix (whole blood, serum, and plasma, respectively).

	Site	Workflow	VIASURE assay
1	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Spain)	VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit using the KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) + VIASURE V-Lab96 Cyclers (Certest Biotec S.L.) + VIASURE assays	VIASURE <i>Malaria</i> Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE <i>Zika Virus</i> Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE <i>P. aeruginosa, K. pneumoniae & P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit

Table 17. Site, workflow, and VIASURE assay.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, and NPV values for VIASURE Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to initial characterization as shown in the following table:

Site	VIASURE assay	Sample matrix	Target	Overall agreement	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	VIASURE Malaria Real Time PCR Detection Kit	Whole blood	<i>Plasmodium falciparum</i>	1 (0.94-1)	62	17	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.77-1)	1 (0.93-1)	1 (0.77-1)
	VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit	Whole blood	<i>Plasmodium falciparum</i>	1 (0.94-1)	62	17	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.77-1)	1 (0.93-1)	1 (0.77-1)
	VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit	serum	ZIKV	1 (0.96-1)	67	20	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.80-0.99)	1 (0.93-0.99)	1 (0.80-1)
	VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit	serum	ZIKV	1 (0.96-1)	67	20	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.80-1)	1 (0.93-1)	1 (0.80-1)
	VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit	plasma	CMV	1 (0.96-1)	70	12	0	0	1 (0.94-1)	1 (0.70-1)	1 (0.94-1)	1 (0.70-1)
	VIASURE Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Real Time PCR Detection Kit	blood culture	MSSA. (Methicillin-sensitive <i>S. aureus</i>)	1 (0.87-1)	4	22	0	0	1 (0.40-1)	1 (0.82-1)	1 (0.40-1)	1 (0.82-1)
		blood culture	MRCoNS (Methicillin-resistant Coagulase-negative <i>Staphylococci</i>)	1 (0.87-1)	10	16	0	0	1 (0.66-1)	1 (0.76-1)	1 (0.66-1)	1 (0.76-1)
	VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit	blood culture	<i>P. aeruginosa</i>	1 (0.87-1)	2	24	0	0	1 (0.20-1)	1 (0.83-1)	1 (0.20-1)	1 (0.83-1)
		blood culture	<i>K. pneumoniae</i>	1 (0.87-1)	4	22	0	0	1 (0.40-1)	1 (0.82-1)	1 (0.40-1)	1 (0.82-1)

Table 18. True positive (TP) and negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV) and Predictive Negative Values (NPV) of VIASURE Malaria Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit, VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit, and VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit.

The results obtained during the performance evaluation show high agreement using VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit using the KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) in combination with VIASURE Real Time PCR Detection Kits and VIASURE V-Lab96 Cycler.

15. Troubleshooting

Issues/Symptoms/Error Warnings/Observation	Possible Causes and Suggestions
Poor yield or low sensitivity	<p>Degradation of the microorganism during shipping/storage and/or processing.</p> <p>Wrong loading of the reagents into the platform. It is recommended to label the reagents 96 deep Well plates to avoid confusion. Preloaded reagents plates must be introduced by locating the first well (A1) in the up-right corner of the rotatory module positions, and in the required order (follow platform user manual).</p> <p>Incomplete sample lysis</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inadequate sample pretreatment. Whole blood must be pretreated to be liquid enough for pipetting. Please consult section 9.2 Sample pretreatment. - No addition or addition of reduced volume of Lysis Buffer, Proteinase K and/or sample. - Not enough heating during the incubation step may reduce the efficiency of lysis and insufficient nucleases inactivation. <p>Incomplete nucleic acid adsorption to beads.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Not enough agitation for Magnetic Beads complete resuspension before addition to the plate. - Magnetic Beads degraded because of wrong storage. Do not mix remaining magnetic beads between kits and storage them as recommended. - Incorrect resuspension of the Carrier. <p>Not appropriate washing</p> <ul style="list-style-type: none"> - Not enough volume of ethanol to resuspend Wash 1 Buffer and/or Wash 2 Buffer, may cause the desorption of nucleic acids from magnetic beads or dragging of inhibitory substances to downstream applications. Add the recommended quantity of ethanol to each bottle, and once rehydrated store it as recommended above. <p>Elution</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nucleic acid degradation because of contaminated consumables. The elution vials or elution plate should be sterile and free from RNAses. - Wrong storage of the purified nucleic acids could cause their degradation. - Contamination of eluted nucleic acid with ethanol before analysis. Avoid platform decontamination with the opened vials or bottles containing nucleic acid nearby.

Malfunction of the automatic platform	<ul style="list-style-type: none"> - Make sure the labware has been placed in the indicated position before starting an extraction run. - Wrong heating and/or shaking. Perform periodical platform maintenance reviews. Abrasive cleaning agents are not recommended, because they are likely to damage the paint finish. For cleaning use a soft cloth or tissue paper. - Run stop because of wrong fasten tip-comb. Try first to manually stretch the tips both lengthwise and width wise to level the tip comb.
Reagent's degradation	<ul style="list-style-type: none"> - Wrong storage of the Extraction Kit reagents before opening. - Wrong storage after the rehydration of the reagents. - Wrong storage of magnetic beads or insufficient agitation before using.
False positive results in qPCR assay	<p>Cross contamination</p> <ul style="list-style-type: none"> - During sample loading, to avoid caps sample mixing, is recommended to label caps and keep them separately among them. - During Proteinase K or Magnetic Beads on the mixture of Lysis Buffer and sample. Change pipette tip among samples. - Cross-contamination with the qPCR VIASURE Positive Controls (in case a qPCR VIASURE Positive Control is used). - Contamination due to qPCR products or samples from previous processing. It is highly recommended to perform properly the end-of-the-day protocol and clean with ethanol to eliminate microbiological risk and contamination sources. - Contamination with ubiquitous microorganisms. It is recommended to decontaminate the platform surface with ethanol after every run. It is highly recommended to perform properly the end-of-the-day protocol and clean with ethanol to eliminate microbiological risk and contamination sources. - Contamination due to Extraction Control (EC) included in this kit on samples to be analyzed by qPCR for <i>E.Coli</i> and/or <i>TEM</i> gene (β-lactamases resistance).
False negative	<p>Analysis of samples with a microbial concentration under limit of detection (LoD).</p> <p>False negative results because of loss of sensitivity.</p> <p>Incorrect run programming of the extraction by user</p>
Variation of fluorescence values in the qPCR assay	They may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.

Table 5. Troubleshooting.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit está diseñado para el aislamiento y purificación de DNA y RNA de virus, bacterias y parásitos a partir de muestras clínicas (sangre total, plasma, suero, hemocultivos y líquido cefalorraquídeo) con fines de diagnóstico posterior mediante el sistema de extracción automática. El kit contiene diferentes reactivos para procesar muestras clínicas en plataformas automatizadas y facilitar la detección sensible de patógenos mediante ensayos de PCR en tiempo real (qPCR y RT-qPCR). Este producto no está destinado al diagnóstico, prevención ni tratamiento de enfermedades.

El kit está concebido para su uso por personal de laboratorio clínico cualificado y formado que haya recibido instrucciones y formación específicas en técnicas moleculares y procedimientos diagnósticos, y que tenga experiencia en la manipulación de muestras de origen humano o materiales potencialmente infecciosos.

2. Información de seguridad

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit contiene materiales peligrosos. Para obtener más información, consultar las hojas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) correspondientes.

Clasificación GSH




Reactivo/Material	Símbolo GHS	Indicaciones de peligro	Consejos de prudencia
Lysis Buffer	 Inflamable, corrosivo y tóxico	Peligro H226, H302, H314, H412	P210, P260, P264, P280, P305+P351+P338, P310, P370+P378
Wash 1 Buffer	 Corrosivo	Peligro H314	P260, P264, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310, P501
Proteinase K	 Peligro	Peligro H315, H319, H334, H335	P261, P280, P284, P304+P340, P342+P311, P403+P233, P501

Tabla 1. Clasificación GHS

Indicaciones de peligro

H226; Líquidos y vapores inflamables.

H302; Nocivo en caso de ingestión.

H314; Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

H315; provoca irritación cutánea.

H319; provoca irritación ocular grave.

H334; Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.

H335; Puede provocar irritación respiratoria.

H412; Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Consejos de prudencia

P210; Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. -No fumar.

P260; No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P261; Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P264; Lavarse las manos concienzudamente tras la manipulación.

P280; Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P284; [En caso de ventilación inadecuada] llevar protección respiratoria.

P304+340; EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.

P305+P351+P338; EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P303+P361+P353; EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL(o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua [o ducharse].

P310; Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P370+P378; En caso de incendio: Utilizar ... para apagarlo.

P501; Eliminar el contenido/el recipiente en ...

P342+P311; En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P403+P233; Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el contenedor bien cerrado.

3. Introducción y explicación

Las muestras del torrente sanguíneo (suero, plasma y sangre) y de las meninges (líquido cefalorraquídeo) pueden ser matrices de interés en el diagnóstico de infecciones. La presencia de virus, bacterias, o parásitos en estas matrices puede derivar de la diseminación de una infección localizada, del crecimiento microbiano en pacientes

inmunodeprimidos, de la contaminación durante procedimientos quirúrgicos o del contacto con fluidos corporales infectados, a través de vectores, o por la patogénesis del propio microorganismo.

El diagnóstico de todos estos microorganismos por métodos convencionales tiene grandes limitaciones. La detección de bacteriemia y fungemia es de gran importancia diagnóstica dado el pronóstico de mortalidad entre el 20% y el 50% de los casos. Las metodologías convencionales basadas en hemocultivos, identificación de microorganismos y posterior estudio de sensibilidad antibiótica son técnicas laboriosas que requieren un mínimo de 48-72 horas. Como estrategia terapéutica se inicia tratamiento empírico con antibióticos de amplio espectro hasta identificar el agente causal de la infección, origen de la resistencia antimicrobiana. En el caso de virus y parásitos, el cultivo es más laborioso, y para evaluar su presencia en sangre se suele recurrir a la serología, que es menos sensible.

El diagnóstico molecular reduce el tiempo, es compatible con el tratamiento antibiótico a diferencia de los cultivos, permite la detección de resistencias y, por tanto, facilita la correcta selección del antibiótico a administrar al paciente, y es automatizable, fácil de aplicar y tiene una buena relación coste-eficacia.

No obstante, para esta técnica es precisa la extracción previa de ácidos nucleicos (AN). Este procedimiento consta de tres pasos principales: extracción o liberación del AN de la muestra y de la célula o microorganismo mediante lisis; separación o aislamiento del AN de otras células o materiales de la muestra, y purificación mediante la eliminación de sustancias inhibitoras. Un cuarto paso opcional, la concentración, es importante para la detección de analitos presentes en concentraciones bajas.

Es imprescindible un kit de extracción para el aislamiento simultáneo de DNA y/o RNA de gran calidad y en una cantidad suficiente a partir de diferentes muestras clínicas y patógenos para su detección específica mediante los ensayos de diagnóstico molecular. En la actualidad, el número cada vez mayor de muestras que deben procesar los laboratorios clínicos exige la posibilidad de automatizar este procedimiento. La adaptación de los reactivos a una plataforma robótica puede mejorar el flujo de trabajo diario, normalizar el tratamiento de las muestras, reducir la variabilidad, reducir los peligros biológicos y evitar la contaminación al reducir el tiempo final de manipulación por el analista.

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit está diseñado para el aislamiento y purificación de DNA y RNA viral, bacteriano y parasitario a partir de diferentes muestras clínicas (sangre total, plasma, suero, hemocultivos y líquido cefalorraquídeo).

4. Procedimiento

El procedimiento de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit se basa en la adsorción espontánea y reversible de los ácidos nucleicos a microesferas superparamagnéticas con una superficie funcionalizada en las condiciones de tamponamiento adecuadas. Después de varios pasos de lavado, los ácidos nucleicos se eluyen en una solución purificada y concentrada. El uso de partículas magnéticas como fase sólida para la adhesión de los ácidos nucleicos permite procesar un número elevado de muestras mediante su exposición simultánea a un campo magnético y, por tanto, automatizar el proceso.

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit se ha diseñado para usarlo con la plataforma automática KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™). El tipo de procedimiento de la plataforma transfiere las Magnetic Beads entre los tubos/pocillos de un reactivo al siguiente mediante atracción de campos magnéticos. La activación y desactivación del campo magnético permite la atracción y la resuspensión de las microesferas en distintos tampones.

En la figura 1 se muestra el principio básico de este tipo de extracción automática. En primer lugar, la lisis se consigue mediante la incubación con el Lysis Buffer que contiene iones caotrópicos apoyados por la digestión con la Proteinase K. A continuación, se añaden las Magnetic Beads y el Carrier al lisado y, después de una incubación, se produce la adsorción de los ácidos nucleicos (1). Las partículas magnéticas se ven atraídas a la superficie de un imán cubierto con puntas de plástico (2) y son transferidas así a otros pocillos que contienen Wash Buffer 1 y Wash Buffer 2 (2 veces) para eliminar los restos celulares y las sales. Después de tres pasos de lavado (3), las microesferas se secan para eliminar los residuos de disolvente orgánico (4). Por último, el DNA o RNA se libera de las partículas magnéticas con un Elution Buffer (5), obteniéndose una muestra pura lista para la cuantificación y el análisis. El DNA y el RNA purificados se pueden utilizar directamente en aplicaciones posteriores. Es muy recomendable el uso de controles de extracción, controles positivos/negativos y controles internos para evaluar el flujo de trabajo completo (véanse los apartados sobre los procedimientos).

Figura 1. Principio básico de extracción basado en partículas magnéticas para un instrumento automático de transferencia de partículas magnéticas.



VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit facilita el procesamiento simultáneo de diferentes muestras en el mismo procesamiento de extracción, aumenta el flujo de trabajo diario, la robustez y la reproducibilidad y reduce la contaminación y el contacto con materiales biológicos peligrosos.

5. Reactivos suministrados

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit incluye los reactivos siguientes, que se detallan en la Tabla 2.

Reactivo/Material	Descripción	Presentación	Cantidad
Lysis Buffer *	Mezcla de reactivos líquidos para la lisis de patógenos y la inactivación de nucleasas	Botella blanca	1 botella x 40 ml
Wash 1 Buffer *	Solución de lavado a la que debe añadirse etanol absoluto (no incluido)	Botella blanca	1 botella x 30 ml
Wash 2 Buffer	Solución de lavado a la que debe añadirse etanol absoluto (no incluido)	Botella blanca	2 botellas x 20 ml

Elution Buffer	Solución para recuperación de ácidos nucleicos	Botella blanca	1 botella x 20 ml
Magnetic Beads	Suspensión de partículas magnéticas para la adsorción de ácidos nucleicos	Vial transparente con tapón azul	1 vial x 1,7 ml
Proteinase K	Solución enzimática para la lisis de los patógenos en un formato estabilizado	Vial transparente con tapón	96 preps
Proteinase K Rehydration Buffer	Tampón de rehidratación para resuspensión de frascos de proteinasa K	Vial transparente con tapón amarillo	1 vial x 1,9 ml
Carrier	Soporte para el producto de precipitación de ácido nucleico	Vial transparente con tapón naranja	96 preps
Carrier Rehydration Buffer	Tampón de rehidratación para resuspensión de viales portadores	Vial transparente con tapón morado	1 vial x 1,9 ml
Extraction Control (EC)	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	Vial verde con tapón	1 vial
Water RNase/DNase Free	Tampón de rehidratación para resuspender el vial del Extraction Control	Vial transparente con tapón transparente	1 vial x 1 ml

* Contiene una sal caotrópica. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Véase el apartado 8 «Advertencias y precauciones».

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados con VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit.

6. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit.

- Sistema de recogida y transporte de las muestras.
- Etanol absoluto.
- Micropipetas.
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Cámara de bioseguridad.
- Pipetas y/o probeta graduada.
- Vortex.
- Termobloque con agitación.
- Equipo de PCR en tiempo real (termociclador).
- VIASURE Real-Time PCR Detection Kits.
- Tubos libres de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) para la recogida y almacenamiento de ácidos nucleicos.
- Controles positivos y negativos para supervisar el proceso de extracción. Se recomienda el uso de controles de extracción positivos y negativos. (Por ejemplo, VIASURE Viral Positive Control Kit).
- Película de sellado para ELISA e incubación general para cubrir la placa de elución y almacenamiento de ácido nucleico. (Opcional)

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit fue testado y validado con el siguiente flujo de trabajo:

- Muestras de sangre total (diluida 1:2 en agua), plasma, suero, hemocultivo, y líquido cefalorraquídeo + KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) + VIASURE Real Time PCR Detection Kits (Certest Biotec S.L) + VIASURE V-Lab96 Cycler (Certest Biotec S.L).

Consumibles recomendados (Solicite las piezas a su Distribuidor Oficial)

A continuación, se presenta una lista de los consumibles recomendados para su uso con el sistema KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) pero no incluidos:

- KingFisher™ deep-well 96 plate - ThermoScientific™
- KingFisher™ 96 plate 200µL - ThermoScientific™
- KingFisher™ 96 tip comb for DW Magnets - ThermoScientific™

Nota: En caso de que los materiales consumibles utilizados difieran de los recomendados para este formato, deberán ser validados por el usuario.

7. Condiciones de transporte y almacenamiento

- Los reactivos del kit se pueden transportar a 15-30 °C y almacenar hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Cuando reciba el kit, revisar todos los componentes para comprobar que no presentan daños. No utilizar los componentes del kit si presentan daños.
- Evitar vibraciones durante el transporte para evitar la fuga de líquidos.
- Se recomienda almacenar Lysis Buffer, Wash 1 Buffer, Wash 2 Buffer, Elution Buffer, Proteinase K Rehydration Buffer, Carrier Rehydration Buffer, Extraction Control y Water RNase/DNase free, a 15-30 °C, protegidos de la luz y fuentes de calor y almacenados en posición vertical para evitar posibles vertidos.
- Se recomienda almacenar los viales de Magnetic Beads refrigerados a 2-8°C inmediatamente después de recibir el kit y para periodos de almacenamiento más largos. Se recomienda no separar en alícuotas.
- Se recomienda almacenar los viales de Proteinase K refrigerados a 2-8°C inmediatamente después de recibir el kit y hasta su resuspensión. Se recomienda no separar en alícuotas. Una vez resuspendido, mantener a -20°C evitando ciclos de congelación y descongelación (hasta 6 veces).
- Se recomienda almacenar los viales Carrier refrigerados a 2-8°C inmediatamente después de recibir el kit y hasta su resuspensión. Se recomienda no separar en alícuotas. Una vez resuspendido, mantener a -20°C evitando ciclos de congelación y descongelación (hasta 6 veces).
- Una vez reconstituido el tubo de Control de Extracción, úselo inmediatamente o almacenarlo a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Se recomienda no separar en alícuotas. Mantener a -20°C evitando ciclos de congelación y descongelación (hasta 6 veces).
- Una vez finalizada la extracción para garantizar la viabilidad de los ácidos nucleicos, mantenga los eluidos refrigerados a 4 °C durante 8 horas antes de su adición a las diferentes aplicaciones posteriores. Para almacenamientos a largo plazo, los eluidos pueden guardarse en la placa de eluidos tapados con película de sellado para ELISA o transferir los eluidos a un vial. Se recomienda almacenar el sobrenadante obtenido en el procesamiento a 2-8°C durante un máximo de 8 horas y/o a -20°C minimizando los ciclos de congelación-descongelación (hasta 3 veces).

La siguiente tabla resume las condiciones de transporte, almacenamiento y uso del Kit completo y de cada uno de sus componentes:

Componentes	Condiciones de transporte	Condiciones de almacenamiento	Condiciones en uso
Todo VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit	15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit.	* See storage conditions of each component.	* See in-use conditions of each component.
Lysis Buffer		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Wash 1 Buffer		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Wash 2 Buffer		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Elution Buffer		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Magnetic Beads		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 2-8°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-8°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.
Proteinase K		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 2-8°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Componente resuspendido: conservar a -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit evitando ciclos de congelación-descongelación (hasta 6 veces).	Uso inmediato a temperatura ambiente
Proteinase K Rehydration Buffer		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Carrier		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 2-8°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Componente resuspendido: conservar a -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit evitando ciclos de congelación-descongelación (hasta 6 veces).	Uso inmediato a temperatura ambiente
Carrier Rehydration Buffer		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Extraction Control		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Before use: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Control rehidratado: utilícelo inmediatamente o consérvelo a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit evitando ciclos de congelación-descongelación (hasta 6 veces).	Uso inmediato a temperatura ambiente
Water RNase/DNase free vial		Almacenar lejos de fuentes de luz y calor. Antes de usar: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 15-30°C durante el periodo de conservación indicado en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.

Tabla 1. Resumen de las condiciones de transporte, almacenamiento y uso del VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y de cada componente.

8. Advertencias y precauciones

- El producto está concebido para su uso por personal de laboratorio clínico cualificado y formado que haya recibido instrucciones y formación específicas en técnicas de extracción de ácidos nucleicos, PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*, incluida la formación sobre el sistema de extracción de ácidos nucleicos y el equipo de PCR en tiempo real (termociclador).
- Para uso diagnóstico *in vitro*.

- Las instrucciones de uso de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit deben leerse atentamente antes de utilizar el producto. No realice el ensayo hasta haber comprendido la información sobre procedimientos, precauciones de seguridad y limitaciones descritas en las Instrucciones de uso.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar el kit si la etiqueta que hace de precinto de la caja exterior está rota.
- No utilizar los reactivos si la caja de protección externa o los sobres que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar el Extraction Control si el material desecante que se incluye en cada sobre no está o está dañado. No retirar el material desecante del sobre que contiene los reactivos una vez abierta.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y /o de proveedores distintos.
- Proteger los reactivos de la humedad y de la luz solar. Una exposición prolongada a la humedad y a la luz solar puede afectar al rendimiento del producto.
- Evitar siempre la contaminación microbiana y por ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables libres de RNasa/DNasa resistentes a aerosoles o de desplazamiento positivo. Utilizar una pipeta nueva para cada muestra. Cambiarse de guantes antes de manipular los reactivos.

Si se realizan otros procedimientos de extracción en la misma zona general del laboratorio, se deben adoptar las precauciones necesarias para garantizar la ausencia de contaminación de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y de cualquier otro reactivo o instrumento necesario para los análisis.

- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. No reutilizar los reactivos y no volver a introducir el volumen de líquido restante en la botella original de reactivo una vez utilizado.
- No reutilizar ningún elemento desechable. No rellenar las botellas una vez vacías debido a que la posible contaminación entre reactivos podría afectar a la sensibilidad del flujo de trabajo.
- Utilizar tubos con tapón de rosca y evitar las posibles salpicaduras o contaminación cruzada de las muestras durante la preparación.
- Después del primer uso, una vez abiertas las botellas de reactivos o abiertos los tubos, cierre cada botella/tubo con los tapones de botella/tubos suministrados para guardarlos. Marque cada tapón de botella/tapón de tubo con un rotulador indeleble. No mezcle el tapón de una botella con el tapón de otra botella. No mezcle los tapones de tubos de un tubo con el tapón de tubos de otro componente.
- No mezcle los tubos del VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit con los del kit de detección de PCR en tiempo real VIASURE. Consulte la sección 9.3.4 Control de extracción liofilizado.
- Evitar la posible contaminación cruzada de los reactivos con los ácidos nucleicos extraídos, los productos de PCR y el control positivo. Para prevenir la contaminación de los reactivos, se recomienda el uso de puntas con filtro.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Usar ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar ni maquillarse en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o con peligro biológico, así como los reactivos y materiales que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tomar las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, manipulación y eliminación de muestras.

- Las muestras y los reactivos deben manipularse en una cabina de seguridad biológica. Utilizar un equipo de protección individual (EPI) conforme con la normativa actual para manipular muestras potencialmente infecciosas. Eliminar los residuos de conformidad con la normativa local, estatal y federal.
- Todos los reactivos deben manipularse con cuidado, reduciendo al mínimo el tiempo de exposición a los reactivos abiertos, sobre todo a los reconstituidos con etanol absoluto.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- La fiabilidad de los resultados depende de la recogida, almacenamiento, transporte y procesamiento adecuados de las muestras.
- Utilizar probetas graduadas para llenar las botellas con etanol.
- Si posteriormente se va a realizar un análisis de qPCR, consultar cada kit de qPCR o el manual de referencia del equipo de PCR en tiempo real para conocer otras advertencias, precauciones y procedimientos.
- El Lysis Buffer y el Wash 1 Buffer contienen una sal caotrópica. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Consultar los peligros y precauciones asociados a la manipulación del Lysis Buffer y el Wash 1 Buffer en las hojas de datos de seguridad de los materiales facilitadas con el dispositivo.
- Comprobar que no se observa precipitación en los reactivos suministrados a su llegada y cada vez que los utilice. Los componentes Lysis Buffer y Wash 1 Buffer contienen sales de guanidina que pueden precipitar. Si se observa precipitación visible en el fondo de la botella, resuspender calentando ligeramente y agitar hasta su completa disolución.
- Comprobar que las partículas magnéticas y el Carrier se hayan resuspendido por completo. Agitar enérgicamente el vial de almacenamiento en un vortex.
- La proteinasa K podría precipitar tras los ciclos de congelación-descongelación. Asegúrese de que la Proteinasa K está completamente resuspendida. Agite enérgicamente el vial de almacenamiento en un Vortex.
- Antes de dispensar VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit en los consumibles de la plataforma, abrir con cuidado cada pocillo, evitando el vertido de los reactivos, y reconstituir los pocillos señalados según se indica en el apartado sobre el procedimiento.
- Comprobar que todos los tubos o placas se hayan colocado debidamente de acuerdo con la disposición indicada y que encajan correctamente en los adaptadores específicos del sistema de extracción automática.
- Los residuos generados con VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit no se han sometido a pruebas de detección de material infeccioso residual. La contaminación del residuo líquido con material infeccioso residual es muy improbable debido al fuerte tratamiento desnaturalizante con Lysis Buffer y Proteinase K, pero no se puede descartar por completo. Por tanto, los residuos líquidos deben considerarse infecciosos y manipularse y eliminarse de conformidad con la normativa local en materia de seguridad.
- La manipulación de sustancias y la eliminación de residuos pueden estar sujetas a la legislación local, estatal o federal, o a normativas relativas a la salud, el medio ambiente o la seguridad. Respete estrictamente las disposiciones correspondientes. Consulte las hojas de datos de seguridad de materiales (MSDS) correspondientes para obtener más información.

9. Procedimiento del test

9.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit es adecuado para varias muestras clínicas humanas potencialmente infecciosas: sangre total, plasma, suero, hemocultivo y líquido cefalorraquídeo. El almacenamiento de la muestra es esencial para obtener unos rendimientos reproducibles y elevados. Los rendimientos pueden variar de una muestra a otra dependiendo de factores como el estado de salud y la edad del donante, el tipo de muestra, la fecha de recogida y las condiciones de transporte y almacenamiento. Pueden utilizarse muestras de **sangre total (diluida 1:2 en agua) y plasma** recogidas en tubos de EDTA (S-Monovette® K3 EDTA, 2.7 ml (Starstedt)), citrato (S-Monovette® Citrate 3ml 9NC, (Starstedt)), Heparina (S-Monovette® Citrate 3ml 9NC, (Starstedt)), Reveos® LR Set CPD/SAG-M Blood Bag Set with RBC leukoreduction filter (TERUMOBCT), Reveos Automated Blood Processing System, anticoagulante citrato fosfato dextrosa (CPD), **muestras de suero** recogidas en polímero activador de la coagulación (S-Monovette® Serum Z-Gel, clotting activator/gel, 7.5 ml, cap brown (Starstedt)) y suero humano (Merk) y **hemocultivo** en BD BACTEC™ Plus Medio aeróbico en viales de cultivo de plástico y BD BACTEC™ Lytic Medio anaeróbico en viales de cultivo de plástico.

La heparina es un conocido inhibidor de la RT-PCR, por lo tanto, es recomendable evitar los tubos de recogida de heparina.

Como recomendación general, las muestras deben recogerse lo antes posible, dependiendo del patógeno, durante la fase aguda de la enfermedad o en cualquier momento de la evolución clínica, y antes de iniciar el tratamiento antibiótico, si es posible. Las muestras deben recogerse en un recipiente estéril, evitando tocar los tejidos adyacentes y las secreciones de órganos que no sean de interés. Todas las muestras deben etiquetarse con el nombre y el número de identificación de la persona de la que se ha obtenido la muestra, la procedencia de la muestra y la fecha y hora de la recogida. Tras la recogida, las muestras deben introducirse en una bolsa para material biológico peligroso y transportarse al laboratorio lo antes posible.

La recogida varía en función del tipo de muestra. Se aconseja seguir las recomendaciones de McPherson R.A., Pincus M.R., Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 23.ª edición. Elsevier Health Sciences; 2017.

De acuerdo con la literatura científica, las condiciones de transporte, almacenamiento y estabilidad dependen del tipo de matriz de muestra y del patógeno que se intenta detectar. Se recomienda utilizar muestras en fresco para la prueba. Las muestras deben conservarse a temperatura ambiente en el caso del líquido cefalorraquídeo (LCR), la sangre y otros fluidos corporales. Si es inevitable un retraso (< 2 horas hasta que se puedan enviar), la regla general es enviarlas a -20°C o, idealmente, a -70°C o -80°C.

Lo ideal es abrir todos los recipientes de muestras en una cabina de seguridad biológica. Se deberán utilizar las barreras adecuadas para prevenir la exposición de la piel y las mucosas a la muestra. Siempre deben usarse guantes y bata de laboratorio para manipular muestras de pacientes. Cuando exista riesgo de salpicaduras o de formación de gotículas, deberán usarse mascarilla, gafas protectoras (o bien trabajar detrás de una pantalla de plástico) y batas o delantales impermeables. Lavarse las manos una vez concluido el proceso.

Las muestras enviadas para análisis molecular deben almacenarse en condiciones controladas para evitar la degradación de los ácidos nucleicos durante el almacenamiento. Evitar los ciclos de congelación y descongelación.

Algunos patógenos procedentes de muestras congeladas y posteriormente descongeladas podrían degradarse y dar lugar a resultados falsos negativos.

Dependiendo de la muestra clínica y del patógeno, pueden necesitarse distintos pretratamientos de la muestra. Deberán seguirse las directrices del protocolo de laboratorio adecuado en cada caso.

Para la recogida, manipulación y análisis de muestras clínicas consulte: la guía de la IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). Una guía para la utilización del laboratorio de microbiología para el diagnóstico de enfermedades infecciosas: actualización de 2018 por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América y la Sociedad Americana de Microbiología. *Enfermedades infecciosas clínicas*, 67(6), e1-e94).

9.2. Pretratamiento de las muestras

Dependiendo de la muestra clínica y del patógeno, pueden necesitarse distintos pretratamientos de la muestra. Es importante evitar sustancias u objetos que puedan interferir en el pipeteado de las muestras durante el proceso automático, por lo que se deben retirar los tapones o los hisopos antes de introducir las muestras en las gradillas para muestras, y las muestras sólidas o muy viscosas deben pretratarse.

- Hemocultivo: Seguir las instrucciones de uso del fabricante para el crecimiento de microorganismos. Tras la incubación, transfiera el sobrenadante a un vial/tubo.
- Sangre entera: esta matriz debe diluirse 1/2 en Agua RNase/DNase Free para aplicaciones de biología molecular.

El resto de las muestras se pueden introducir directamente en la plataforma.

9.3. Resuspensión / preparación de reactivos

Por favor, lea detenidamente cada una de las secciones de preparación o resuspensión de reactivos para conocer todas las precauciones y recomendaciones que deben tomarse.

Antes de comenzar con la extracción y purificación de ácidos nucleicos, en algunos reactivos es necesario añadir un determinado volumen de otros reactivos (algunos de ellos no están incluidos en el kit). La siguiente tabla indica qué reactivo debe añadirse y el volumen necesario:

Reactivo/Material	Reactivo para resuspensión/preparación	Volumen
Wash 1 Buffer	Etanol absoluto	70mL
Wash 2 Buffer (I)	Etanol absoluto	80 mL
Wash 2 Buffer (II)	Etanol absoluto	80 mL
Proteinase K	Proteinase K Rehydration Buffer	1,7 mL
Carrier	Carrier Rehydration Buffer	1,7 mL
Extraction Control	Water RNase/DNase Free	1 mL
Magnetic Beads	-	-

Tabla 2. Reactivos y volúmenes a resuspender/preparar en los reactivos.

Después del primer uso, una vez abiertas las botellas de reactivos o abiertos los tubos, cierre cada botella/tubo con los tapones de botella/tubos suministrados para guardarlos. Marque cada tapón de botella/tapón de tubo con un rotulador indeleble. No mezcle el tapón de una botella con el tapón de otra botella. No mezcle los tapones de tubos de un tubo con el tapón de tubos de otro componente. No mezcle los tubos de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit con los de VIASURE Real Time PCR Detection Kit.

9.3.1. Preparación de los Buffer

El Lysis Buffer y Wash 1 Buffer contienen sales de guanidina que pueden precipitar. Si hay precipitado visible en el fondo de la botella, resuspender mediante calentamiento suave y agitar hasta su completa disolución antes de abrir la botella para el primer uso. En los siguientes usos, asegúrese del cierre correcto con la tapa de la botella antes de realizar este paso.

Antes de comenzar con la extracción y purificación de ácidos nucleicos, en algunos reactivos es necesario añadir un determinado volumen de otros reactivos (no incluidos en el kit). La siguiente tabla indica qué reactivo debe añadirse y el volumen necesario:

Reactivo/Material	Reactivo para resuspension/preparación	Volumen
Wash 1 Buffer*	Etanol absoluto	70mL
Wash 2 Buffer (I)*	Etanol absoluto	80 mL
Wash 2 Buffer (II)*	Etanol absoluto	80 mL

Tabla 3. Reactivos y volúmenes para añadir en el Wash 1 Buffer y Wash 2 Buffer.

**Nota: Para facilitar el proceso, se ha incluido una marca en la etiqueta de cada reactivo para marcar cuando se añaden los reactivos.*

Además, se recomienda asegurarse de escribir con rotulador indeleble las botellas específicas del sistema automatizado de extracción utilizadas una vez preparados en el espacio con la fecha de resuspensión y demás información requerida.

Utilice tubos de ensayo graduados para llenar las botellas con etanol absoluto.

9.3.2. Resuspension de la Proteinasa K

Antes de comenzar con la extracción y purificación de ácidos nucleicos, es necesario resuspender la Proteinasa K (vial transparente con tapón) con 1,7 mL de Proteinase K Rehydration Buffer (vial transparente con tapón amarillo) incluido en el kit.

Se recomienda mantener los viales de Proteinasa K refrigerados a 2-8°C inmediatamente después de recibir el kit y una vez resuspendidos conservarlos a -20°C evitando ciclos de congelación-descongelación (hasta 6 veces).

9.3.3. Resuspensión del Carrier

Antes de comenzar con la extracción y purificación de ácidos nucleicos, es necesario resuspender Carrier (vial transparente con tapón naranja) con 1,7 mL de Carrier Rehydration Buffer (vial transparente con tapón morado) incluido en el kit. Asegúrese de que el Carrier está completamente resuspendido. Agite enérgicamente el vial de almacenamiento en un Vortex.

Se recomienda mantener los viales de Carrier refrigerados a 2-8°C inmediatamente después de recibir el kit y una vez resuspendidos conservarlos a -20°C evitando ciclos de congelación-descongelación (hasta 6 veces).

9.3.4. Control de Extracción Liofilizado

El uso del Control de Extracción (CE) sólo será necesario para los productos VIASURE Real Time PCR que no incluyan un control interno en la mezcla de reacción liofilizada. Consulte las Instrucciones de uso de cada producto VIASURE para comprobar esta información. Para estos productos VIASURE Real Time PCR utilice el Control de Extracción (CE) suministrado en el VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit.

Se recomienda abrir y manipular el Control de Extracción (CE) en el área del laboratorio previa a la PCR, lejos del área de amplificación de la PCR. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 1 mL de Water RNase/DNase free (vial transparente con tape transparente) suministrada y agitar a fondo en vórtex.

Una vez resuspendido el Control de Extracción, guárdelo a -20°C y minimice los ciclos de congelación y descongelación (hasta 6 ciclos).

Nota 1: Añadir 5 µl del CE rehidratado a la mezcla muestra y Lysis Buffer para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Nota 2: Debido a la naturaleza de la síntesis o producción del control de extracción, no utilice el Control de Extracción (CE) incluido en este kit (VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit) en muestras que vayan a ser analizadas por qPCR para la detección de *E.Coli* y/o gen *TEM* (resistencia a las β-lactamasas). En este caso, utilice el vial de control de extracción (EC) incluido en el VIASURE Real Time PCR Detection Kit.

9.3.5 Magnetic Beads

Antes de comenzar con la extracción y purificación de ácidos nucleicos, asegúrese de que las Magnetic Beads estén completamente resuspendidas. Agite enérgicamente el vial de almacenamiento en un Vortex. Las Magnetic Beads se incluyen en un vial transparente de 1,7 ml con tapón azul.

Se recomienda mantener los viales de perlas magnéticas en refrigeración a 2-8°C inmediatamente después de recibir el kit.

9.4. Procedimiento de extracción

A continuación, se proporcionan instrucciones sobre los pasos necesarios para procesar muestras. Consulte el manual del usuario de KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) para obtener instrucciones sobre cómo utilizar la plataforma y el procedimiento de extracción a seguir dentro de las plataformas automáticas KingFisher® Flex. (Nota: Si se utiliza VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit con otro sistema de extracción automática diferente del mencionado en estas instrucciones de uso, el usuario deberá validar el procedimiento).

1. Carga de los reactivos en placas de 96 pocillos profundos

Cargar las siguientes 5 placas con los volúmenes y reactivos en los pocillos correspondientes, dependiendo del número de muestras que se vaya a analizar.

- a. Placa de muestras: Lysis Buffer 300 µl, muestra 200 µl, Extraction Control rehidratado 5 µl (opcional), Proteinase K 15 µl, Magnetic Beads 15 µl y Carrier 15 µl.
- b. Placa Wash 1: Wash 1 Buffer 800 µl.
- c. Placa Wash 2 (I): Wash 2 Buffer 800 µl.
- d. Placa Wash 2 (II): Wash 2 Buffer 800 µl.
- e. Placa Elution: Elution Buffer 100 µl.

Nota: se recomienda identificar /marcar cada placa. Pipetear cada componente por separado para evitar posibles contaminaciones y asegurar la correcta funcionalidad de los reactivos.

2. Configuración del instrumento.

Poner en marcha el equipo.

Seleccionar el protocolo de extracción Blood_Pathogens utilizando las teclas del cursor y pulsando START o utilizando el Software BindIt para ejecutar el protocolo deseado a través del PC. Si no se ha creado, seguir las instrucciones siguientes y crearlo con el Software BindIt.

1. Definir un Layout de placa (introducir el nombre y la información de los reactivos tal y como se describe en 1 Carga de los reactivos en placas de 96 pocillos profundos).
2. Configurar el protocolo añadiendo los pasos descritos en la siguiente tabla:

Nombre de la etapa	Procedimiento	Configuración
Recolección (Pick Up)	Placa 96 puntas	
Lisis y Unión (Lysis and Binding)	Placa de muestra	
Inicio de la etapa	Pre-recogida	No
Parámetros de Agitación/Incubación	Liberación magnética	Si
	Tiempo de agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:10:00, Rápido
	Incubación durante agitado	Si
	Temperatura del bloque (°C)	65
	Pre-calentamiento	Si
Fin de la etapa	Post-agitación	No
	Repeticiones para recogida de partículas (<i>Collect beads, count</i>)	5
	Tiempo para recogida de partículas (s)	0
Recogida de partículas	Placa de muestra	
	Repeticiones para recogida de partículas (<i>Collect beads, count</i>)	5
	Tiempo para recogida de partículas (s)	4
Lavado 1 (Wash 1)	Placa Wash 1	
Inicio de la etapa	Pre-recogida	No
	Tiempo de liberación magnética (hh:mm:ss), velocidad	00:00:20, Agitado en el fondo

Parámetros de Agitación/Incubación	de	Tiempo de primer agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:00:20, Agitado en el fondo
		Tiempo de segundo agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:00:20, Rápido
		Número de secuencias de agitación (<i>Loop count</i>)	3
		Incubación durante agitado	No
	Fin de la etapa	Post-agitación	No
		Repeticiones para recogida de partículas (<i>Collect beads count</i>)	5
		Tiempo para recogida de partículas (s)	3
Lavado 2 (I) (Wash 2 (I))		Placa Wash 2 (I)	
Parámetros de Agitación/Incubación	Inicio de la etapa	Pre-recogida	No
		Tiempo de liberación magnética (hh:mm:ss), velocidad	00:00:20, Rápido
		Tiempo de primer agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:00:10, Agitado en el fondo
		Tiempo de segundo agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:00:20, Rápido
		Número de secuencias de agitación (<i>Loop count</i>)	3
		Incubación durante agitado	No
	Fin de la etapa	Post-agitación	No
		Repeticiones para recogida de partículas (<i>Collect beads count</i>)	4
		Tiempo para recogida de partículas (s)	2
Lavado 2 (II) (Wash 2 (II))		Placa Wash 2 (II)	
Parámetros de Agitación/Incubación	Inicio de la etapa	Pre-recogida	No
		Tiempo de liberación magnética (hh:mm:ss), velocidad	00:00:20, Rápido
		Tiempo de primer agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:00:10, Agitado en el fondo
		Tiempo de segundo agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:00:20, Rápido
		Número de secuencias de agitación (<i>Loop beads count</i>)	3
		Incubación durante agitado	No
	Fin de la etapa	Post-agitación	No
		Repeticiones para recogida de partículas (<i>Collect count</i>)	4
		Tiempo para recogida de partículas (s)	2
Dry		Placa Wash 2 (II)	
		Dry time	2 min
		Tip position	Fuera del pocillo/tubo
Elución (Elution)		Placa Elution	
Inicio de la etapa		Pre-recogida	No
		Tiempo de liberación magnética (hh:mm:ss), velocidad	00:00:00, Si

Agitación/Incubación	Tiempo de primer agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:00:20, Agitado en el fondo
	Tiempo de segundo agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:00:45, Media
	Número de secuencias de agitación (<i>Loop count</i>)	6
	Incubación durante agitado	Si
	Temperatura del bloque (°C)	75
	Pre-calentamiento	Si
	Post-agitación	No
	Repeticiones para recogida de partículas (<i>Collect count</i>)	5
Fin de la etapa	Tiempo para recogida de partículas (s)	2
Recogida de partículas	Placa Elution	
Inicio de la etapa	Pre-recogida	No
	Liberación magnética	No
	Tiempo de agitado (hh:mm:ss), velocidad	00:02:00, Baja
	Recogida de partículas magnéticas	No
Parámetros de Agitación/Incubación		
Fin de la etapa		
Finalización (Leave)	Placa de puntas	

Table 4. Configuración completa del proceso de extracción a seguir dentro de las plataformas automáticas KingFisher® Flex.

3. Configuración de la placa en el instrumento.

Seguir la interfaz gráfica del instrumento y llenar la plataforma con las placas siguiendo este orden:

Nota. Comprobar que todas las placas estén cargadas en la misma dirección, con el pocillo A1 en la parte superior derecha.

- 1st. Placa de puntas (KingFisher™ 96 plate 200µL - ThermoScientific™ + KingFisher™ 96 tip comb for DW Magnets - ThermoScientific™).
- 2º. Placa de Eución.
- 3rd. Placa del Wash 2 (II) Buffer.
- 4th. Placa del Wash 2 (I) Buffer.
- 5º. Placa del Wash 1 Buffer.
- 6º. Placa de muestras.

Una vez cargadas las placas, hacer clic en «Start» (Iniciar) y el procesamiento se completará en 38 minutos.

4. Recuperación de ácidos nucleicos purificados

Una vez finalizada la extracción para garantizar la viabilidad de los ácidos nucleicos, mantenga los eluidos refrigerados a 4 °C durante 8 horas antes de añadirlo a las diferentes aplicaciones posteriores. Para almacenamientos a largo plazo, los eluidos pueden guardarse en la placa de eluidos tapados con película de sellado para ELISA o transferir los eluidos a un vial. Se recomienda almacenar el sobrenadante obtenido en el procesamiento a 2-8°C durante un máximo de 8 horas y/o a -20°C minimizando los ciclos de congelación-descongelación (hasta 3 veces).

Una vez finalizada la configuración de la extracción y de la PCR, transferir la placa cargada al termociclador para la amplificación de los ácidos nucleicos, siguiendo las indicaciones del fabricante.

5. Descontaminación

Descontaminar debidamente las superficies internas de la plataforma con disolventes desinfectantes adecuados y desechar los consumibles de plástico usados.

Para obtener más detalles, consultar el manual del usuario de KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™).

9.5. PCR en tiempo real

Los ácidos nucleicos obtenidos con VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit son compatibles con cualquier kit qPCR o RT-qPCR disponible en el mercado, aunque solo se ha validado con los kits VIASURE Real Time PCR Detection.

Deben seguirse las instrucciones del fabricante de los kits VIASURE Real Time PCR Detection (<https://www.certest.es/es/viasure/>). Los controles positivos y negativos incluidos en el paso de extracción no deben sustituir a los controles positivos y negativos suministrados con los kits de qPCR.

Se recomienda utilizar el termociclador VIASURE V-Lab96 Cycler (Certest Biotec S.L) para el análisis y la interpretación de los resultados.

10. Interpretación de los resultados

Para interpretar correctamente los resultados de los controles y las muestras clínicas, consultar las instrucciones del fabricante de las diferentes aplicaciones posteriores.

11. Limitaciones del procedimiento

- La eficiencia de las características de rendimiento de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit para KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) depende de los métodos de recogida, transporte, almacenamiento y/o manipulación de las muestras y de la eficiencia del diagrama de flujo utilizado en cada laboratorio para el ensayo de qPCR y el termociclador. Si se desea utilizar otros procedimientos completos distintos de los indicados en estas instrucciones de uso, el usuario final deberá validarlos en su totalidad.
- Para obtener un rendimiento y una cantidad adecuados, la recogida, el almacenamiento y el pretratamiento de las muestras deben llevarse a cabo de acuerdo con las recomendaciones específicas de las guías oficiales para laboratorios.
- Si los materiales consumibles utilizados difieren de los recomendados para este formato, el usuario deberá validarlos.
- VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit puede automatizarse en la plataforma automática KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™). Es preciso leer detenidamente este manual de instrucciones y el manual del usuario del KingFisher™ Flex antes de su uso. Si el proceso de automatización se lleva a cabo en una plataforma diferente de manipulación con partículas magnéticas utilizando otros consumibles, el usuario deberá validarlo.
- Las botellas deben almacenarse a 15-30 °C alejado de la luz y de fuentes de calor y almacenarse en posición vertical para evitar cualquier posible derrame, las Magnetic Beads refrigeradas a 2-8°C y la Proteinasa K, el

Carrier y el Control de Extracción almacenados a -20°C (hasta 6 ciclos de congelación-descongelación). También es importante comprobar las condiciones de almacenamiento de los componentes una vez abierto el kit. Consulte la sección 7 de las instrucciones de uso del kit.

- Debido a la naturaleza del control de la extracción, la síntesis o la producción no utilice el Control de Extracción (CE) incluido en este kit (VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit) en muestras que vayan a analizarse mediante qPCR para la detección de *E.Coli* y/o gen *TEM* (resistencia a las β -lactamasas). En este caso, utilice el vial de Control de Extracción (CE) incluido en el VIASURE Real Time PCR Detection Kit.
- La sangre total debe diluirse 1:2 en agua debido a un correcto pretratamiento de la muestra. Si la sangre total no se diluye, podría afectar al pipeteado del instrumento.
- La heparina es un conocido inhibidor de la RT-PCR, por lo tanto, es recomendable evitar los tubos de recogida de heparina. (Como anticoagulantes o tubos de recogida).

12. Control de calidad

Los valores esperados de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit dependen del procedimiento diagnóstico (extracción y ensayo de qPCR), por lo que cada procedimiento completo debe ser validado por el usuario final.

Se recomienda usar VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit junto con los controles adecuados para supervisar todo el proceso para diferentes aplicaciones posteriores. Para controlar todo el proceso, desde el procesamiento de las muestras hasta el análisis, aplicar los controles siguientes: Control Positivo (no proporcionado), Control Negativo (no proporcionado) y Control de Extracción (proporcionado con el kit).

13. Características de funcionamiento analítico

Las dianas modelo elegidas para el procedimiento de diseño, optimización y validación del VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit deben generar el máximo número de tipos de muestras diferentes, de modo que cada diana modelo esté asociado a un tipo de muestra. Estos modelos diana se han elegido en función de los siguientes criterios: frecuencia clínica, ventas comerciales de los productos VIASURE qPCR, dificultad de lisis, diana NA y tamaño NA.

13.1 Linealidad analítica

La linealidad del ensayo se determinó testando diluciones específicas de cada patógeno validado en diferentes matrices biológicas utilizando la cepa de referencia certificada como se muestra en la tabla siguiente.

Patógeno	Cepa de referencia	Matriz	Rango lineal
Zika Virus	1st WHO International Standard for Zika Virus RNA (PEI code: 11468/16)	Suero	$1 \times 10^4 - 1.1 \text{ IU}/\mu\text{l}$
		Sangre total	$1 \times 10^4 - 1.1 \text{ IU}/\mu\text{l}$
<i>Plasmodium falciparum</i>	1st WHO International Standard for Plasmodium falciparum DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 04/176)	Sangre total	$5 \times 10^4 - 5 \text{ IU}/\mu\text{l}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® BAA-2146™)	Hemocultivo aeróbico	$5 \times 10^1 - 5 \times 10^{-3} \text{ CFU}/\mu\text{l}$
		Hemocultivo anaerobio	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^{-2} \text{ CFU}/\mu\text{l}$
<i>Cytomegalovirus</i>	1st World Health Organization Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic acid Amplification techniques (NIBSC code: 09/162)	Plasma	$1 \times 10^2 - 1 \text{ IU}/\mu\text{l}$

Tabla 4. Linealidad.

En conclusión, todos los ensayos de PCR en tiempo real mostraron una eficacia y linealidad aceptables, (R^2) fueron $>0,9$ en todas las reacciones diana ensayadas.

13.2. Sensibilidad analítica. Límite de Detección (LoD)

La sensibilidad analítica o límite de detección (LoD) se determinó basándose en el LoD obtenido en el ensayo (RT)-qPCR utilizado para el procedimiento de validación. Las muestras se extrajeron con VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit utilizando KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) y se analizaron con el termociclador VIASURE V-Lab96 Cyclor (Certest Biotec S.L).

Los resultados obtenidos mostraron que los LoD son los siguientes para los patógenos modelo elegidos, con una tasa de positividad del 95%:

Patógeno	Cepa de referencia	Matriz	LoD
Zika Virus	1st WHO International Standard for Zika Virus RNA (PEI code: 11468/16)	Suero	0.5 IU/ μ l
		Plasma	1 IU/ μ l
		Sangre total	0.5 IU/ μ l
<i>Plasmodium falciparum</i>	1st WHO International Standard for Plasmodium falciparum DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 04/176)	Sangre total	5 IU/ μ l
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® BAA-2146™)	Hemocultivo aeróbico	0.005 CFU/ μ l
		Hemocultivo anaerobio	0.01 CFU/ μ l
<i>Cytomegalovirus</i>	1st World Health Organization Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic acid Amplification techniques (NIBSC code: 09/162)	Plasma	1 IU/ μ l
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (ATCC®13091™)	LCR	2 CFU/ μ l

Tabla 5. Límite de detección (LoD).

13.3. Exactitud

13.3.1. Veracidad

La veracidad de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit se evaluó con el material de referencia que se indica a continuación.

Cepas de referencia: la validez de los resultados obtenidos durante la validación del producto se ha verificado utilizando diferentes cepas de referencia para cada patógeno. Cepas utilizadas:

- **The American Type Culture Collection ("ATCC®").**
 - *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® BAA-2146™)
 - *Neisseria meningitidis* (ATCC®13091™)
 - Mumps Virus (ATCC®VR-106™)
- **National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).**
 - 1st WHO International Standard for Plasmodium falciparum DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 04/176).
 - 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic acid Amplification techniques (NIBSC code: 09/162).

- 1st WHO International Standard for HHV -6B virus DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 15/266).
- 1st WHO International Standard for BK virus DNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 14/212).
- **The Paul-Ehrlich-Institut (PEI).**
 - 1st WHO International Standard for Zika Virus RNA (PEI code: 11468/16).
 - 1st WHO International Standard for Chikungunya virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (PEI code: 11785/16).
 - PEI Reference Preparation WNV Lineage 1 RNA (#13299/19).
- **bei RESOURCES.**
 - Dengue virus type 1 (DEN-1) strain Hawaii (bei RESOURCES Ref: NR-82 (derived from ATCC® VR-1254™).
 - *Leishmania donovani* strain 1S (MHOM/SD/62/1S) (bei RESOURCES Ref: NR-48821).

13.3.2. Precisión

Para determinar la precisión de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit utilizando KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™), se realizaron ensayos intraensayo (repetibilidad), interensayo (reproducibilidad), interlote (precisión intermedia) e intertermociclador (entre laboratorios). El panel de muestras se analizó siguiendo el flujo de trabajo VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit utilizando KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™), VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *Zika Virus* Real Time PCR Detection Kit y VIASURE V-Lab96 Cyclor (Certest Biotec S.L).

Intraensayo. Repetibilidad.

La repetibilidad se comprobó analizando réplicas, todas las muestras se analizarán hasta doce réplicas en un día utilizando VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y el flujo de trabajo seleccionado. Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

Muestra	Diana	Canal Viasure	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo 1 (2-3xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	32.61	0.46	1.41
Positivo 2 (10xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	31.14	0.40	1.28
Muestra negativa	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Control de Extracción	HEX	21.44	0.34	1.57

Tabla 6. LoD. Intraensayo repetibilidad de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Muestra	Diana	Canal Viasure	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo 1 (2-3xLoD)	Zika Virus	FAM	34.93	1.06	3.04
Positivo 2 (10xLoD)	Zika Virus	FAM	33.29	0.43	1.29
Muestra negativa	Zika Virus	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Control de Extracción	HEX	19.70	0.15	0.75

Tabla 7. Intraensayo repetibilidad de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Interensayo. Reproducibilidad.

La reproducibilidad se comprobó analizando las distintas muestras en tres días diferentes por tres operadores distintos con VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y el flujo de trabajo seleccionado. En las tablas siguientes se muestra un resumen de los resultados.

Muestra	Diana	Canal Viasure	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo 1 (2-3xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	33.89	1.09	3.22
Positivo 2 (10xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	32.57	1.09	3.34
Muestra negativa	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Control de Extracción	HEX	22.54	1.75	7.76

Tabla 8. Interensayo reproducibilidad de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Muestra	Diana	Canal Viasure	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo 1 (2-3xLoD)	Zika Virus	FAM	34.00	1.07	3.14
Positivo 2 (10xLoD)	Zika Virus	FAM	32.49	0.62	1.92
Muestra negativa	Zika Virus	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Control de Extracción	HEX	22.17	1.67	7.55

Tabla 9. Interensayo reproducibilidad de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Interlote. Precisión Intermedia.

Los valores interlotes se determinaron con tres réplicas de las diferentes muestras utilizando tres lotes de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y el flujo de trabajo seleccionado. Los resultados se describen en las siguientes tablas.

Muestra	Diana	Canal Viasure	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo 1 (2-3xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	34.21	0.48	1.41
Positivo 2 (10xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	31.95	0.42	1.32
Muestra negativa	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Control de Extracción	HEX	23.67	0.33	1.39

Tabla 10. Precisión intermedia interlote de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Muestra	Diana	Canal Viasure	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo 1 (2-3xLoD)	Zika Virus	FAM	34.42	1.50	4.37
Positivo 2 (10xLoD)	Zika Virus	FAM	32.48	0.74	2.29
Muestra negativa	Zika Virus	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Control de Extracción	HEX	20.78	1.04	4.99

Tabla 11. Precisión intermedia interlote de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y VIASURE *Zika Virus* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Entre laboratorios. Inter termociclador

Los valores intertermociclador se determinaron con tres réplicas de las mismas muestras utilizadas para intraensayo, interensayo e interlote, utilizando el VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit, VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit y VIASURE *Zika Virus* Real Time PCR Detection Kit en los termocicladores CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), VIASURE V-Lab96 Cycler (Certest Biotec S.L.) y QuantGene 9600 qPCR equipment (BIOER). Los resultados se describen en las tablas siguientes.

Muestra	Diana	Canal Viasure	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo 1 (2-3xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	37.06	1.00	2.69
Positivo 2 (10xLoD)	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	34.10	3.85	11.30
Muestra negativa	<i>Plasmodium falciparum</i>	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Control de Extracción	HEX	22.15	1.02	4.63

Tabla 12. Inter termociclador de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit. ((Ct) = ciclo umbral, (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Muestra	Diana	Canal Viasure	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo 1 (2-3xLoD)	Zika Virus	FAM	35.71	1.31	3.66
Positivo 2 (10xLoD)	Zika Virus	FAM	32.55	0.83	2.56
Muestra negativa	Zika Virus	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	Control de Extracción	HEX	22.56	1.89	8.37

Tabla 13. Inter termociclador de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit y VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit. ((Ct) = ciclo umbral, (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

13.4. Especificidad analítica

Interferencias e inhibidores

Se realizó un estudio de sustancias interferentes para probar el posible efecto de interferencia de sustancias endógenas y exógenas en VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit utilizando VIASURE Real Time PCR Detection Kits y el termociclador VIASURE V-Lab96 Cycler (Certest Biotec S.L.). Se evaluaron un total de 27 (para sangre total y suero) y 20 (para plasma) sustancias potencialmente interferentes.

Evaluación de la interferencia en todo el proceso (extracción y (RT)-qPCR)

Se obtuvieron los siguientes resultados en el análisis en muestras de sangre total y suero:

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
Zinc / Sulfato de Zinc	1,20E-02 mg/ml	N.I
Ácido acetilsalicílico	3,00E-02 mg/ml	N.I
Ibuprofeno	2,19E-01 mg/ml	N.I
Sulfato/fosfato de cloroquina	6,00E-01 mg/ml	N.I
Aciclovir	6,60E-02 mg/ml	N.I
Foscarnet	7,00E-01 mg/ml	N.I
Oseltamivir	3,99E-04 mg/ml	N.I
Ampicilina	7,50E-02 mg/ml	N.I
Ceftriaxona	8,40E-01 mg/ml	N.I
Hiclate de doxiciclina	1,80E-02 mg/ml	N.I

Metronidazol	1,23E-01 mg/ml	N.I
Vancomicina	1,20E-01 mg/ml	N.I
EDTA	9,90E-04 mg/ml	N.I
Heparina	3,30E+00 unidades/ml	N.I
Lorazepam	7,20E-04 mg/ml	N.I
Albúmina	1,00E+01 mg/ml	N.I
Bilirrubina	4,00E-01 mg/ml	N.I
DNA Genómico	3,50E-03 mg/ml	N.I
Glucosa	1,00E+01 mg/ml	N.I
Hemoglobina Humana	1,00E+01 mg/ml	N.I
Inmunoglobulina G	2,00E+01 mg/ml	N.I
Lactato	9,00E-01 mg/ml	N.I
Leucocitos	6,25E+06 célula/ml	N.I
Triglicéridos	1,50E+01 mg/ml	N.I
4-Acetamidofenol	1,56E-01 mg/ml	N.I
Dexametasona	1,20E-02 mg/ml	N.I
Omeprazol	8,40E-03 mg/ml	N.I

Tabla 14. Sustancias potencialmente interferentes. N.I: Interferencias no notificables.

En el análisis en muestras de plasma se obtuvieron los siguientes resultados:

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
Ácido acetilsalicílico	3.00E-02 mg/ml	N.I
Ibuprofeno	2.19E-01 mg/ml	N.I
Naproxeno	3.60E-01 mg/ml	N.I
Cidofovir	8.10E-02 mg/ml	N.I
Foscarnet	7.00E-01 mg/ml	N.I
Ganciclovir	3.20E-02 mg/ml	N.I
Valganciclovir	2.20E-02 mg/ml	N.I
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	9.90E-04 mg/ml	N.I
Heparina	3.30E+00 units/ml	N.I
	7.50E-09 mg/ml	N.I
Ciclato de doxiciclina	1.00E+01 mg/ml*	N.I
17-α-Ethinilestradiol	4.00E-01 mg/ml	N.I
Albúmina	3.50E-03 mg/ml	N.I
Bilirrubina	1.00E+01 mg/ml	N.I
DNA genómico	1.50E+01 mg/ml	N.I
Hemoglobina humana	2.58E-03 mg/ml	N.I
Triglicéridos	1.13E+00 mg/ml	N.I
Azatioprina	4.20E-02 mg/ml	N.I
Ciclosporina	9.90E-05 mg/ml	N.I
Micofenolato mofetilo	1.56E-01 mg/ml	N.I
Prednisona	3.00E-02 mg/ml	N.I
4-Acetamidofenol	2.19E-01 mg/ml	N.I

Tabla 15. Sustancias potencialmente interferentes. N.I: Interferencias no notificables.

En conclusión, se analizaron diferentes sustancias potencialmente interferentes en sangre total (diluida 1:2), suero y plasma. No se observaron interferencias de ninguna de las sustancias evaluadas a las concentraciones indicadas para cada flujo de trabajo.

13.6. Trazabilidad metrológica

Este dispositivo no está diseñado para fines de medición.

14. Características del funcionamiento clínico

Para determinar la exactitud del diagnóstico clínico, se han realizado diferentes evaluaciones con diferentes matrices de muestras clínicas en Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Spain) en colaboración con entidades nacionales.

El funcionamiento clínico de VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit utilizando KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) fue evaluado utilizando muestras clínicas contaminadas (79 de sangre total, 87 de suero y 82 de plasma) y con 26 hemocultivos de pacientes con sospecha de bacteriemia. Para la evaluación utilizando muestras contaminadas, se usaron las siguientes cepas para generar al menos n= 30 muestras enriquecidas a 2x LoD, n=10 a 5x LoD, n=10 a 10x LoD de *Plasmodium falciparum* (NIBSC code: 04/176), Zika Virus (PEI code: 11468/16) y Human Cytomegalovirus (NIBSC code: 09/162), cada una en la matriz clínica apropiada (sangre total, suero y plasma, respectivamente).

	Lugar	Proceso	VIASURE kit
1	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Spain)	VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit utilizando KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) + VIASURE V-Lab96 Cyclor (Certest Biotec S.L.) + VIASURE assay	VIASURE Malaria Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Real Time PCR Detection Kit
			VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit

Tabla 16. Lugar, proceso y kit VIASURE.

Los verdaderos valores positivos y negativos, los valores de falsos positivos y negativos, la sensibilidad, especificidad, PPV y NPV para VIASURE Real Time PCR Detection Kit fueron calculados en relación con cada ensayo de comparación como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	VIASURE Kit	Matriz	Diana	Concordancia	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	VIASURE Malaria Real Time PCR Detection Kit	Sangre total	<i>Plasmodium falciparum</i>	1 (0.94-1)	62	17	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.77-1)	1 (0.93-1)	1 (0.77-1)
	VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit	Sangre total	<i>Plasmodium falciparum</i>	1 (0.94-1)	62	17	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.77-1)	1 (0.93-1)	1 (0.77-1)
	VIASURE Zika Virus Real	suero	ZIKV	1 (0.96-1)	67	20	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.80-0.99)	1 (0.93-0.99)	1 (0.80-1)

	Time PCR Detection Kit											
	VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit	suero	ZIKV	1 (0.96-1)	67	20	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.80-1)	1 (0.93-1)	1 (0.80-1)
	VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit	plasma	CMV	1 (0.96-1)	70	12	0	0	1 (0.94-1)	1 (0.70-1)	1 (0.94-1)	1 (0.70-1)
	VIASURE Methicillin- resistant Staphylococ- cus aureus Real Time PCR Detection Kit	hemoculti vo	MSSA. (Methicillin- sensitive S- aureus)	1 (0.87-1)	4	22	0	0	1 (0.40-1)	1 (0.82-1)	1 (0.40-1)	1 (0.82-1)
		hemoculti vo	MRCoNS (Methicillin- resistant Coagulase- negative Staphyloco- cci	1 (0.87-1)	10	16	0	0	1 (0.66-1)	1 (0.76-1)	1 (0.66-1)	1 (0.76-1)
	VIASURE P. aeruginosa, K. pneumoniae & P. mirabilis Real Time PCR Detection Kit	hemoculti vo	P. aeruginosa	1 (0.87-1)	2	24	0	0	1 (0.20-1)	1 (0.83-1)	1 (0.20-1)	1 (0.83-1)
		hemoculti vo	K. pneumonia e	1 (0.87-1)	4	22	0	0	1 (0.40-1)	1 (0.82-1)	1 (0.40-1)	1 (0.82-1)

Tabla 17. Valores de verdadero positivo (TP) y negativo (TN), valores de falso positivo (FP) y falso negativo (FN), sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV) y valores predictivos negativos (NPV) para VIASURE Malaria Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit, VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit, y VIASURE P. aeruginosa, K. pneumoniae & P. mirabilis Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados obtenidos durante la evaluación del rendimiento muestran una alta concordancia utilizando VIASURE Blood Pathogens Extraction Kit en KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™) en combinación con VIASURE Real Time PCR Detectan Kits y VIASURE V-Lab96 Cycler.

15. Solución de problemas

Problemas/Síntomas/Mensajes de Error/Observaciones	Posibles Causas y Sugerencias
Rendimiento escaso o sensibilidad baja	<p>Degradación del microorganismo durante el transporte/almacenamiento y/o procesamiento.</p> <p>Carga incorrecta de los reactivos en la plataforma. Se recomienda etiquetar las placas de 96 pocillos profundos para evitar confusiones. Las placas precargadas con reactivos deben introducirse localizando el primer pocillo (A1) en la esquina superior derecha de las posiciones rotatorias del módulo, y en el orden correcto (seguir el manual del usuario de la plataforma).</p>

	<p>Lisis incompleta de la muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pretratamiento insuficiente de la muestra. Las muestras de sangre total deben pretratarse para que sean lo suficientemente líquidas como para pipetearlas. Por favor, consulte la sección 9.2 Pretratamiento de muestras. - Omisión de la adición o adición de un volumen insuficiente de Lysis Buffer, Proteinase K y/o muestra. - Un calentamiento insuficiente durante el paso de incubación podría reducir la eficiencia de la lisis y provocar una inactivación insuficiente de las nucleasas. <p>Adsorción incompleta de los ácidos nucleicos a las microesferas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Agitación insuficiente para la resuspensión completa de las Magnetic Beads antes de añadirlas a la placa. - Degradación de las Magnetic Beads debido a un almacenamiento incorrecto. No mezclar las Magnetic Beads sobrantes de distintos kits y almacenarlas en las condiciones recomendadas. - Resuspensión incorrecta del Carrier. <p>El lavado no es adecuado</p> <ul style="list-style-type: none"> - Si no se usa un volumen suficiente de etanol para resuspender el Wash 1 Buffer y/o el Wash 2 Buffer, se podría producir la desorción de los ácidos nucleicos de las Magnetic Beads o el arrastre de sustancias inhibitoras a las aplicaciones posteriores. Añadir la cantidad recomendada de etanol a cada depósito y, tras la rehidratación, almacenar en las condiciones recomendadas con anterioridad. <p>Elución</p> <ul style="list-style-type: none"> - Degradación de los ácidos nucleicos debido a la contaminación de los consumibles. Los viales o placas de elución deben ser estériles y estar libres de RNasas. - Un almacenamiento incorrecto de los ácidos nucleicos purificados podría ocasionar su degradación. - Contaminación del ácido nucleico eluido con etanol antes del análisis. Evitar descontaminar la plataforma cerca de viales o pocillos abiertos que contengan ácidos nucleicos.
Funcionamiento incorrecto de la plataforma automática	<ul style="list-style-type: none"> - Comprobar que el material de laboratorio se ha colocado en la posición indicada antes de comenzar un procesamiento de extracción. - Parámetros incorrectos de calentamiento y/o agitación. Realizar las revisiones periódicas de mantenimiento de la plataforma. No se recomienda usar productos de limpieza abrasivos, ya que podría dañar la pintura de la cubierta. Para la limpieza, utilizar un paño suave o un pañuelo de papel. - El procesamiento puede detenerse por mal ajuste de la placa peine de 96 puntas. En primer lugar, intentar doblar manualmente el peine de puntas a lo largo y a lo ancho para nivelarlo y facilitar su posterior ajuste en la plataforma.
Degradación del reactivo	<ul style="list-style-type: none"> - Almacenamiento incorrecto de los reactivos del Extraction Kit antes de abrirlos. - Almacenamiento incorrecto tras la rehidratación de los reactivos.

	<ul style="list-style-type: none"> - Almacenamiento incorrecto de las Magnetic Beads o agitación insuficiente antes de su uso.
Resultados falsos positivos en el ensayo de qPCR	<p>Contaminación cruzada</p> <ul style="list-style-type: none"> - Durante la carga de las muestras, para evitar mezclar los tapones de las muestras, se recomienda etiquetar los tapones y mantenerlos separados unos de otros. - Durante la adición de Proteinase K o Magnetic Beads a la mezcla de Lysis Buffer y muestra. Cambiar la punta de la pipeta entre las muestras. - Contaminación cruzada con el qPCR VIASURE Positive Controls (si se utiliza un qPCR VIASURE Positive Control). - Contaminación debida a productos o muestras de qPCR de un procesamiento previo. Es muy recomendable realizar correctamente el protocolo de final del día y la limpieza con etanol para eliminar las fuentes de riesgo microbiológico y contaminación. - Contaminación con microorganismos ubicuos. Se recomienda descontaminar la superficie de la plataforma con etanol después de cada procesamiento. Es muy recomendable realizar correctamente el protocolo de final del día y la limpieza con etanol para eliminar las fuentes de riesgo microbiológico y contaminación. - Contaminación debida al Control de Extracción (CE) incluido en este kit en muestras que vayan a analizarse mediante qPCR para la detección de <i>E.Coli</i> y/o gen <i>TEM</i> (resistencia a las β-lactamasas).
Falso negativo	<p>Análisis de muestras con una concentración microbiana inferior al límite de detección.</p> <p>Resultados falsos negativos debido a pérdida de sensibilidad.</p> <p>Programación incorrecta del procesamiento de la extracción por el usuario</p>
Variación de los valores de fluorescencia en el ensayo de qPCR	<p>Podrían variar debido a numerosos factores, como: equipo de PCR, tipo de muestra y tratamiento previo de la muestra, entre otros.</p>

Tabla 5. Solución de problemas.













Bibliography/Bibliografía

1. Ali, N., Rampazzo, R. de C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*, 2017, 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
2. Berensmeier, S. (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 495–504. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0675-0>
3. Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R. 3rd, & Smith, T. F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 165–256. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>

4. Thatcher, S. A. (2015). DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clinical Chemistry*, 61(1), 89–99. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221374>
5. Vila, J., Gómez, M. D., Salavert, M., & Bosch, J. (2017). [Methods of rapid diagnosis in clinical microbiology: Clinical needs]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.11.004>.
6. World Health Organization (WHO). (2018). Antimicrobial. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
7. Abdollahi, H., Savari, M., Zahedi, M. J., Moghadam, S. D., & Hayatbakhsh Abasi, M. (2011). Detection of A2142C, A2142G, and A2143G Mutations in 23s rRNA Gene Conferring Resistance to Clarithromycin among *Helicobacter pylori* Isolates in Kerman, Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 36(2), 104–110
8. Ali, N., R. de C. P. Rampazzo, A. D. T. Costa, and M. A. Krieger. 2017. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res. Int.* 2017:9306564.
9. Abdollahi, H., Savari, M., Zahedi, M. J., Moghadam, S. D., & Hayatbakhsh Abasi, M. (2011). Detection of A2142C, A2142G, and A2143G Mutations in 23s rRNA Gene Conferring Resistance to Clarithromycin among *Helicobacter pylori* Isolates in Kerman, Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 36(2), 104–110
10. Di Terlizzi, R., & Platt, S. (2006). The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part I - function and composition. *Veterinary Journal* (London, England: 1997), 172(3), 422–431. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.021>
11. Emaus, M. N., M. Varona, D. R. Eitzmann, S.-A. Hsieh, V. R. Zeger, and J. L. Anderson. 2020. Nucleic acid extraction: Fundamentals of sample preparation methodologies, current advancements, and future endeavors. *TrAC Trends Anal. Chem.* 130:115985.
12. Guo, Z., Y. Wang, A. Yang, and G. Yang. 2016. The effect of pH on charge inversion and condensation of DNA. *Soft Matter. The Royal Society of Chemistry* 12:6669–6674.
13. Jurado R, Walker HK. Cerebrospinal Fluid. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK398/>
14. Islam, M., A. Aryasomayajula, and P. Selvaganapathy. 2017. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines* 8:83.
15. MacVane, S. H., & Nolte, F. S. (2016). Benefits of Adding a Rapid PCR-Based Blood Culture Identification Panel to an Established Antimicrobial Stewardship Program. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(10), 2455–2463. <https://doi.org/10.1128/JCM.00996-16>.
16. Marco, F. (2017). Métodos moleculares para el diagnóstico de septicemia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(9), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.03.002>
17. Niu, M., M. Du, Z. Gao, C. Yang, X. Lu, R. Qiao, and M. Gao. 2010. Monodispersed Magnetic Polystyrene Beads with Excellent Colloidal Stability and Strong Magnetic Response. *Macromol. Rapid Commun.* 31:1805–1810.
18. Rittich, B., and A. Spanová. 2013. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *J. Sep. Sci. Germany* 36:2472–2485.
19. Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek, and R. Johne. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol. England* 113:1014–1026.
20. Strich, J. R., Heil, E. L., & Masur, H. (2020). Considerations for Empiric Antimicrobial Therapy in Sepsis and Septic Shock in an Era of Antimicrobial Resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, 222(Suppl 2), S119–S131. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa221>

21. Wang, H.-Y., Kim, S., Kim, J., Park, S.-D., Uh, Y., & Lee, H. (2014). Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 1911–1920. <https://doi.org/10.1128/JCM.00389-14>
22. Wu, D.-W., Li, Y.-M., & Wang, F. (2017). How Long can we Store Blood Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis. *EBioMedicine*, 24, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.09.024>
23. Zhang, X., M. R. Servos, and J. Liu. 2012. Surface Science of DNA Adsorption onto Citrate-Capped Gold Nanoparticles. *Langmuir* 28:3896–3902.
24. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Geneva: World Health Organization; 2012 Dec. Annex 3, Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143256/>

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
	CE marking Marcado CE		Keep away from sunlight Mantener fuera de la luz del sol						

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	05/05/2023

Table 6. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 5th May 2023

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