



VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Group A Streptococcus

CE IVD



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

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-GAS106L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-GAS106H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GAS112L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GAS112H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-GAS113L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-GAS113H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS136
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS172
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-GAS101L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-GAS101H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS101

Table A 1. References for Open and Rotor-Gene format with internal control products. / Referencias para productos Open y Rotor-Gene Format con control interno.

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-GAS196T

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / Referencias para productos formato Tubo con control interno.

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 3) / OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 3)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-GAS106LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-GAS106HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GAS112LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GAS112HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-GAS113LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-GAS113HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS136E
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS172E
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-GAS101LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-GAS101HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS101E

Table A 3. References for Open and Rotor-Gene format with extraction control products. / Referencias para productos Open y Rotor-Gene Format con control de extracción.

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 4) / FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 4)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-GAS196TE

Table A 4.References for Tube format with extraction control products. / Referencias para productos formato Tubo con control de extracción.

Content

1.	Intended use	6
2.	Summary and Explanation	6
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	7
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	7
6.	Transport and storage conditions.....	8
7.	Precautions for users	8
8.	Test procedure	9
9.	Result interpretation	10
10.	Limitations of the test	13
11.	Quality control.....	14
12.	Performance characteristics.....	14
	ANNEX 1	17
A1.1	Principle of the procedure.....	17
A1.2	Reagents provided.....	17
A1.3	Test procedure	18
	ANNEX 2	20
A2.1	Principle of the procedure.....	20
A2.2	Reagents provided.....	20
A2.3	Test procedure	20
	ANNEX 3	23
A3.1	Principle of the procedure.....	23
A3.2	Reagents provided.....	23
A3.3	Test procedure	25
	ANNEX 4	27
A4.1	Principle of the procedure.....	27
A4.2	Reagents provided.....	27
A4.3	Test procedure	27

Contenido

1.	Uso previsto.....	30
2.	Introducción y explicación	30

3.	Procedimiento	30
4.	Reactivos suministrados	31
5.	Material requerido y no suministrado	31
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento	32
7.	Precauciones para el usuario	32
8.	Procedimiento del test	34
9.	Interpretación de resultados.....	35
10.	Limitaciones del test	38
11.	Control de calidad	38
12.	Características del test	39
	ANEXO 1	41
A1.1	Procedimiento	41
A1.2	Reactivos suministrados	41
A1.3	Procedimiento del test	42
	ANEXO 2.....	44
A2.1	Procedimiento	44
A2.2	Reactivos suministrados	44
A2.3	Procedimiento del test	44
	ANEXO 3.....	47
A3.1	Procedimiento	47
A3.2	Reactivos suministrados	47
A3.3	Procedimiento del test	49
	ANEXO 4.....	51
A4.1	Procedimiento	51
A4.2	Reactivos suministrados	51
A4.3	Procedimiento del test	52
	Bibliography/Bibliografía	54
	Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	54
	Trademarks.....	54

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific detection of DNA of the *Streptococcus pyogenes* (group A (beta-hemolytic) *Streptococcus* (Strep-A)) in pharyngeal and otic exudate swabs from patients with signs and symptoms of respiratory infection. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of *Streptococcus pyogenes* infection in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for *Streptococcus pyogenes*.

2. Summary and Explanation

Group A *Streptococcus*, also known as group A beta-hemolytic streptococcus (GAS), is a gram-positive bacterium that grows on chains, producing white to grayish colonies surrounded by a halo of hemolysis when grown in blood agar medium. It differs from other beta-hemolytic streptococci by possessing, in its cell wall, a group A specific polysaccharide antigen (Lancefield antigen).

It is spread mainly by contact, for example, through sneezing or kissing. Some people can carry the bacteria without showing signs of illness.

Group A *Streptococcus* is usually responsible for upper respiratory tract infections and skin infections. In some cases, infection with these microorganisms can go beyond acute episodes and trigger serious post-infectious syndromes such as acute rheumatic fever and glomerulonephritis. Diseases caused by this microorganism are usually classified as suppurative diseases (pharyngotonsillitis, scarlet fever, impetigo, erysipelas, toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis) and non-suppurative (rheumatic fever and acute glomerulonephritis).

In order to avoid these complications, a timely and adequate diagnosis and treatment is essential to avoid the risk of the appearance of suppurative sequelae and, especially, non-suppurative sequelae.

The reference test is the culture of tonsillar exudate, whose sensitivity and specificity are high but has limitations such as the delay in the result, and which does not allow us to distinguish between acute infection and carrier status. That is why, since the 1980s, rapid immunological techniques have been developed that are simple to use and low cost, which allow streptococcal antigen to be detected in a few minutes, and currently molecular diagnostic methods have also been developed as they provide greater sensitivity and specificity.

3. Principle of the procedure

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *Streptococcus pyogenes* in clinical samples. After DNA isolation, the identification of *Streptococcus pyogenes* is performed by the amplification of a conserved region of the *speB* gene, using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent

signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format.

4. Reagents provided

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open and rotor-gene format with internal control products, Annex 2 for tube format with internal control products, Annex 3 for open and rotor-gene format with extraction control products and Annex 4 for tube format with extraction control products.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1 and 3).
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C.
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format (Annex 2 and 4).

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506). To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

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

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

- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

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

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from light.
- For Tube format kits: Once the *Group A Streptococcus* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25°C±5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at – 20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).

7. Precautions for users

- The product is indented for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and in vitro diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-GAS113L, VS-GAS113H, VS-GAS136 and VS-GAS172, VS-GAS113LE, VS-GAS113HE, VS-GAS136E and VS-GAS172E). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-GAS136 and VS-GAS172, VS-GAS136E and VS-GAS172E (compatible for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.

- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious, 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, storage, treatment 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 waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" does not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because it does not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open and Rotor-Gene format with internal control products Test Procedure, Annex 2 for Tube format with internal control products Test Procedure, Annex 3 for Open and Rotor-Gene format with extraction control products Test Procedure and Annex 4 for Tube format with extraction control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit has been validated tested in pharyngeal swabs in Stuart-Amies media (Deltalab) and otic exudate collected from swabs in Amies liquid transport medium (Transystem™, COPAN). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), It is recommended shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 72 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids

Otic exudates can be collected from standard swab with transport medium or with sterile wide-mouth, hermetically sealed bottle (samples obtained by aspiration). It is recommended to process the sample as soon as possible. The samples can be stored at room temperature for up to 2 hours. For long term store, it is recommended to keep the samples at -20°C or lower.

8.2. DNA extraction

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

For DNA extraction from respiratory samples and otic exudates, you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. We have validated the following extraction kits:

- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co).
- Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, using COBAS® AmpliPrep (ROCHE)
- Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex.).

9. Result interpretation

9.1. References with internal control (references in Annex 1 and 2)

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

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

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

Controls	<i>Streptococcus pyogenes</i> (FAM) ¹	Internal Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	≥40 or no signal	≤40	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls

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

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

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

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

<i>Streptococcus pyogenes</i> (FAM)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
≤40	≤40 ≥40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≤40	<i>Streptococcus pyogenes</i> Positive
≥40 or no signal	≤35 ²	≥40 or no signal	≤40	<i>Streptococcus pyogenes</i> Negative
≥40 or no signal	≥35 ² or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Invalid
≤40	≤35 ²	≤40	≤40	Invalid

Table 2. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curves.

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

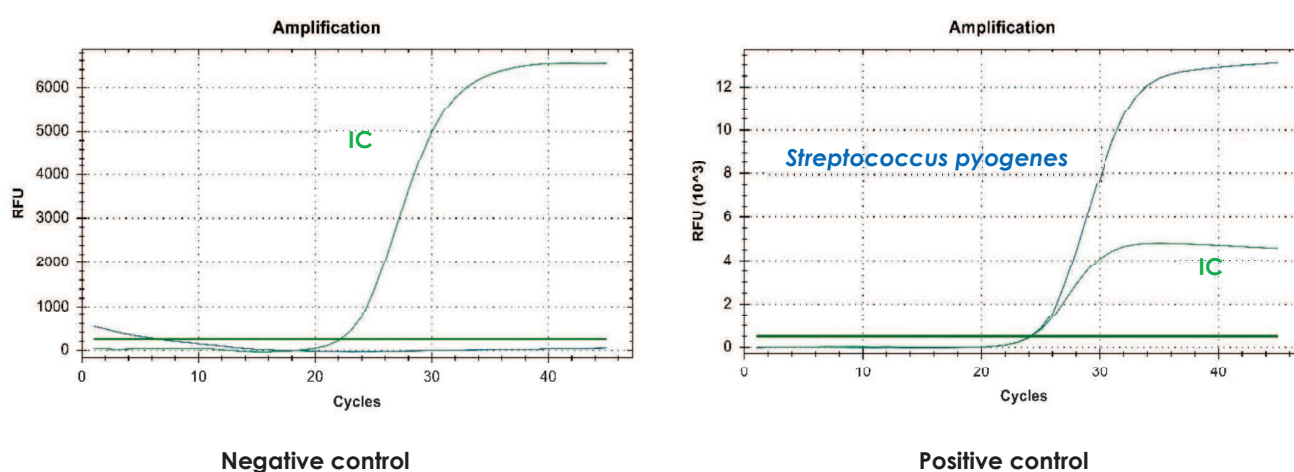
2 In the case of Group A *Streptococcus* target genes negative, IC must show an amplification signal with Ct less than 35. If there is an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

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

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

9.2. References with extraction control (references in Annex 3 and 4)

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

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Streptococcus pyogenes* in the positive control well. For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	<i>Streptococcus pyogenes</i> (FAM) ¹	Extraction Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	≥40 or no signal	≤40	Valid

Table 3. Expected Performance of Controls

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

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

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

For interpretation of individual patient sample results, use the following criteria for read and analyze the results:

<i>Streptococcus pyogenes</i> (FAM)	External control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
≤40	≤40 ≥40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≤40	<i>Streptococcus pyogenes</i> Positive
≥40 or no signal	≤35 ²	≥40 or no signal	≤40	<i>Streptococcus pyogenes</i> Negative
≥40 or no signal	≥35 or no signal ₂	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Invalid
≤40	≤35 ²	≤40	≤40	Invalid

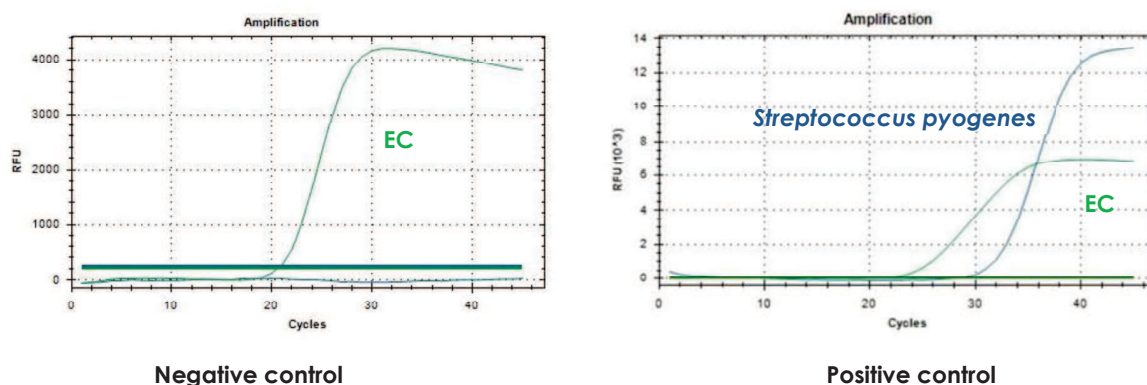
Table 4. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve.

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

2 In the case of *Streptococcus pyogenes* target genes negative, EC must show an amplification signal with Ct less than 35. If there is an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the Extraction Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

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

Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with DNA extracted from pharyngeal and otic exudate collected from swabs.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; properly extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted.

- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Group A Streptococcus*, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and *Group A Streptococcus* Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNAse free (white vial). Each procedure must take place in established order and in separate laboratory areas.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the bacterial DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *Streptococcus pyogenes* variant.
 - A bacterial load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of antibiotics used to prevent the infection or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable bacteria and does not imply that these bacteria are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets bacterial sequences.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Group A Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit was tested using clinical samples (pharyngeal and otic exudate collected from swabs) from patients with suspected respiratory infection. In order to determine the clinical diagnostic accuracy, different multicenter evaluations have been conducted through collaboration with national entities. A summary of the sites, sample type and workflow is included in the following table. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain)	Pharyngeal swabs	Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, using COBAS® AmpliPrep / MagLEAD® 12gC nucleic acid extractor using MagDEA® Dx reagents / Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit and Invisorb® Spin Universal Kit + AriaMx Real-time PCR System/Applied BioSystem 7500 RT PCR System	<i>Streptococcus pyogenes</i>
2	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain)	Otic exudate swabs	Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, using COBAS® AmpliPrep / MagLEAD® 12gC nucleic acid extractor using MagDEA® Dx reagents / Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit and Invisorb® Spin Universal Kit + AriaMx Real-time PCR System/Applied BioSystem 7500 RT PCR System	<i>Streptococcus pyogenes</i>

Table 5. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following tables:

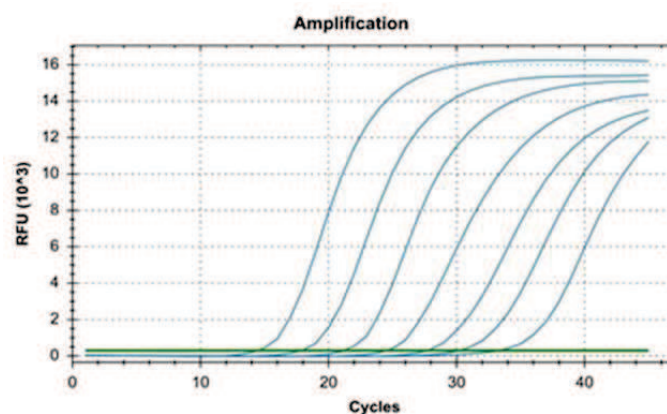
Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	<i>Streptococcus pyogenes</i> Real-TM Quant kit molecular assay.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	95	288	1	0	1 (0.96-1)	0.99 (0.98-1)	1 (0.96-1)	0.99 (0.98-1)
2	<i>Streptococcus pyogenes</i> Real-TM Quant kit molecular assay.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	15	7	0	0	1 (0.78-1)	1 (0.59-1)	1 (0.78-1)	1 (0.59-1)

Table 6. True positive (TP) and negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV), Predictive Negative Values (NPV) for VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit.

Results show high agreement to detect *Streptococcus pyogenes* using VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for *Streptococcus pyogenes* (Figure 3).

Figure 3. Dilution series of *Streptococcus pyogenes* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).

12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Streptococcus pyogenes* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	-	Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) virus	-	Human Adenovirus Types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/California/7/2009 (H1N1) virus	-	Human Bocavirus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Legionella longbeache</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Respiratory Syncytial virus (RSV) A and B	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Human rhinovirus type C	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-				

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *Streptococcus pyogenes* Rosenbach 1884, showing positive results.

ANNEX 1

OPEN FORMAT AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-GAS106L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-GAS106H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GAS112L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GAS112H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-GAS113L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-GAS113H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS136
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS172
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-GAS101L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-GAS101H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS101

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

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

Target	Channel	Gene
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	<i>speB</i> gene
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A1 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.ceratest.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3, A1.4 and A1.5. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices. Table A1.5 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.ceratest.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1/6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	1/6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-GAS101L, VS-GAS101H, VS-GAS106L, VS-GAS106H, VS-GAS112L and VS-GAS112H.

Reagent/Material	Description	Color	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-GAS113L and VS-GAS113H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent	9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	9/18 X 4-cap strip

Table A1 5. Reagents and materials provided in VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-GAS101, VS-GAS136 and VS-GAS172. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control

Group A *Streptococcus* Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized Group A *Streptococcus* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A1.3.2 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Group A Streptococcus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A1 6. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Streptococcus pyogenes*) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check the most common detection channels consult website www.certest.es). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-GAS196T

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	speB gene
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A2. 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, channel, to check most common detection channels consult website www.ceratest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-GAS196T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

Group A *Streptococcus* Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized Group A *Streptococcus* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *Group A Streptococcus* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A2.3.3 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *Group A Streptococcus* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Group A Streptococcus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the plate, the strips, or tube in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.cer-test.es).

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

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Streptococcus pyogenes*) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to

check the most common detection channels consult website www.certest.es). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 3

OPEN FORMAT AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-GAS106LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-GAS106HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GAS112LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GAS112HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-GAS113LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-GAS113HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS136E
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS172E
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-GAS101LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-GAS101HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS101E

Table A3. 1. References.

A3.1 Principle of the procedure

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

Target	Channel	Gene
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	speB gene
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A3. 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.certest.es.

A3.2 Reagents provided

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A3.3, A3.4 and A3.5. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A3.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A3.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices. Table A3.5 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es)

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1/6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	1/6/12 x 8-cap strip

Table A3. 3. Reagents and materials provided in VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-GAS101LE, VS-GAS101HE, VS-GAS106LE, VS-GAS106HE, VS-GAS112LE and VS-GAS112HE.

Reagent/Material	Description	Color	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A3. 4. Reagents and materials provided in VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-GAS113LE and VS-GAS113HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	2/9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/9/18 x 4-cap strip

Table A3. 5. Reagents and materials provided in VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-GAS101E, VS-GAS136E and VS-GAS172E. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A3.3 Test procedure

A3.3.1 Lyophilized extraction control

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

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

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

A3.3.2 Lyophilized positive control

Group A Streptococcus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Group A Streptococcus* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A3.3.3 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

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

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Group A Streptococcus* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

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

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene® kit).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A3. 6. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Streptococcus pyogenes*) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check the most common detection channels consult website www.certest.es). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 4

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-GAS196TE

Table A4. 1. References.

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPS, buffer and polymerase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	speB gene
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A4. 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.ceratest.es.

A4.2 Reagents provided

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A4.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A4. 3. Reagents and materials provided in VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-GAS196TE.

A4.3 Test procedure

A4.3.1 Lyophilized extraction control

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

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

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

A4.3.2 Lyophilized positive control

Group A Streptococcus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Group A Streptococcus* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *Group A Streptococcus* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A4.3.4 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *Group A Streptococcus* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

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

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Group A Streptococcus* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

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

Close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips or tube in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A4. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Streptococcus pyogenes*) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check the most common detection channels consult website www.certest.es). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit es una prueba de RT-PCR en tiempo real diseñada para la detección específica del DNA de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo beta-hemolítico del grupo A (Strep-A)) en hisopos faríngeos y exudados óticos de pacientes con signos y síntomas de infección respiratoria. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de la infección de *Streptococcus pyogenes* en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de muestras, amplificado mediante PCR a tiempo real y detectado mediante el uso de oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente para detectar *Streptococcus pyogenes*.

2. Introducción y explicación

Streptococcus de grupo A, también conocido como estreptococo beta-hemolítico del grupo A (GAS, por sus siglas en inglés), es una bacteria gram-positiva que crece en cadenas, produciendo colonias de color blanco a grisáceo, rodeadas de un halo de hemólisis cuando se cultiva en medio agar-sangre. Se diferencia de otros estreptococos beta-hemolíticos por poseer, en su pared celular, un antígeno polisacárido específico de grupo A (antígeno de Lancefield).

Se contagia esencialmente por contacto, por ejemplo, a través de estornudos o besos. Algunas personas pueden portar la bacteria sin presentar síntomas de enfermedad.

Streptococcus de grupo A suele ser responsable de infecciones del tracto respiratorio superior y de infecciones en la piel. En algunas ocasiones la infección por estos microorganismos puede ir más allá de los episodios agudos y desencadenar síndromes post-infecciosos graves como fiebre reumática aguda y glomerulonefritis. Habitualmente las enfermedades ocasionadas por este microorganismo se catalogan en enfermedades supurativas (faringoamigdalitis, escarlatina, impétigo, erisipela, síndrome del shock tóxico y fascitis necrotizante) y no supurativas (fiebre reumática y glomerulonefritis aguda).

Para evitar estas complicaciones es esencial un diagnóstico y tratamiento oportuno y adecuado que evite el riesgo de aparición de las secuelas supuradas y, especialmente, las no supuradas.

La prueba de referencia es el cultivo de exudado amigdalar, cuya sensibilidad y especificidad son elevadas, pero presenta limitaciones como la demora en el resultado, y que no permite distinguir entre infección aguda y estado de portador. Es por ello que, desde la década de los 80, se han desarrollado técnicas inmunológicas rápidas de sencilla utilización y de bajo coste, que permiten en unos minutos poder detectar el antígeno estreptocócico y actualmente también se han desarrollado métodos moleculares de diagnóstico ya que aportan una mayor sensibilidad y especificidad.

3. Procedimiento

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *Streptococcus pyogenes* en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Streptococcus pyogenes* se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos

específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen *speB*.

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit utiliza la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado.

4. Reactivos suministrados

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para open format y rotor-gene format con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el Anexo 3 para open format y rotor-gene format con productos con control de extracción y el Anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor Gene (Anexos 1 y 3).
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o ≤ -70°C.
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen) y Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

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

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

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

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

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial *Group A Streptococcus* Reaction-Mix ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico in vitro (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.

- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-GAS113L, VS-GAS113H, VS-GAS136, VS-GAS172, VS-GAS113LE, VS-GAS113HE, VS-GAS136E and VS-GAS172E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para VS-GAS136, VS-GAS172, VS-GAS136E and VS-GAS172E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, o fumar o aplique de productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" no requiere ficha de datos de seguridad debido a que se clasifica como no peligroso para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para open format y rotor-gene format con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el Anexo 3 para open format y rotor-gene format con productos con control de extracción y el Anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection kit ha sido validado en muestras faríngeas en medio Stuart-Amies (Deltalab) y de exudado ótico recogidas mediante hisopos en medio de transporte líquido Amies (Transystem™, COPAN). Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras respiratorias se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes pueden ser transportados entre 2-8°C hasta 72 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 72 horas, se recomienda realizar el envío a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 72 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -70°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Los exudados óticos se pueden recoger mediante hisopos estándar con medio de transporte o en un frasco estéril de boca ancha herméticamente sellado (especialmente en muestras obtenidas por aspiración). Se recomienda procesar la muestra lo antes posible. Las muestras se pueden almacenar a temperatura ambiente hasta un máximo de 2 horas. Para un almacenamiento a largo plazo, se recomienda mantener las muestras a -20°C o menos.

8.2. Extracción de DNA

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

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

- MagDEA Dx SV kit, utilizando el Sistema de extracción magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, utilizando el sistema de extracción COBAS® AmpliPrep (ROCHE).
- Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

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

El uso de controles positivos y negativos en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para *Streptococcus pyogenes* en el pocillo de control positivo. Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	<i>Streptococcus pyogenes</i> (FAM) ¹	Control Interno (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	≥40 or no signal	≤40	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

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

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

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

<i>Streptococcus pyogenes</i> (FAM)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
≤40	≤40 ¹ ≥40 o sin señal ¹	≥40 o sin señal	≤40	<i>Streptococcus pyogenes</i> Positivo
≥40 o sin señal	≤35 ²	≥40 o sin señal	≤40	<i>Streptococcus pyogenes</i> Negativo
≥40 o sin señal	≥35 o sin señal ²	≥40 o sin señal	≥40 o sin señal	No válido
≤40	≤35 ²	≤40	≤40	No válido

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores. sin señal = sin curva de amplificación.

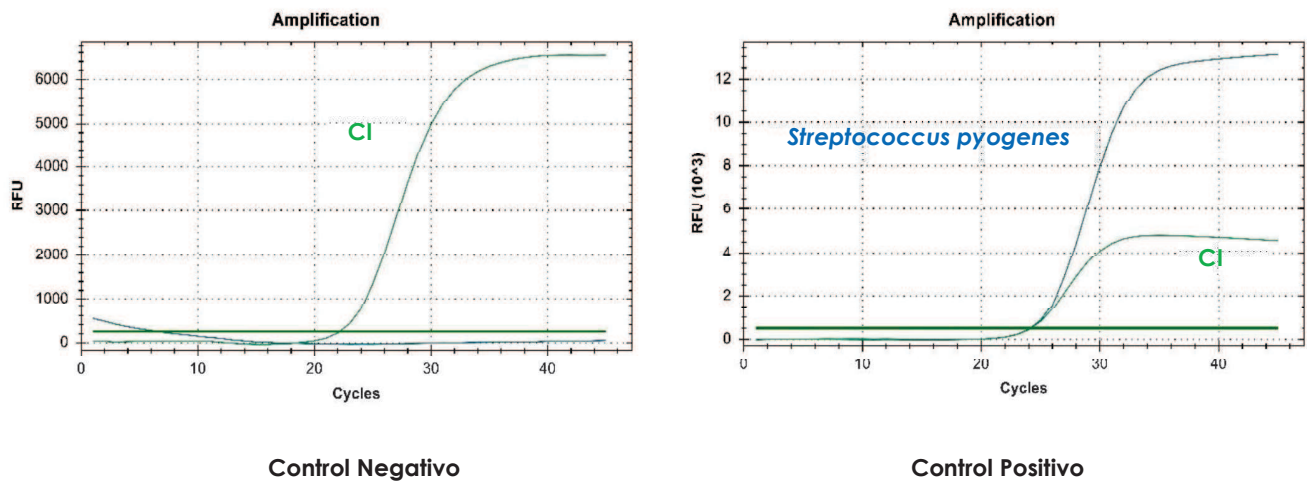
1 El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

2 En el caso de que los genes diana de *Streptococcus pyogenes* resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct ≥ 35 del control interno, el resultado se

considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Una muestra se considera negativa si esta no presenta amplificación de señal en el sistema de detección, pero el control interno es positivo.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System



9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)

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

El uso de controles positivos y negativos en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para *Streptococcus pyogenes* en el pocillo de control positivo. Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	<i>Streptococcus pyogenes</i> (FAM) ¹	Control Interno (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	≥40 or no signal	≤40	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

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

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

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

<i>Streptococcus pyogenes</i> (FAM)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
≤40	≤40 ≥40 o sin señal ¹	≥40 o sin señal	≤40	<i>Streptococcus pyogenes</i> Positivo
≥40 o sin señal	≤35	≥40 o sin señal	≤40	<i>Streptococcus pyogenes</i> Negativo
≥40 o sin señal	≥35 o sin señal ²	≥40 o sin señal	≥40 o sin señal	No válido
≤40	≤35 ²	≤40	≤40	No válido

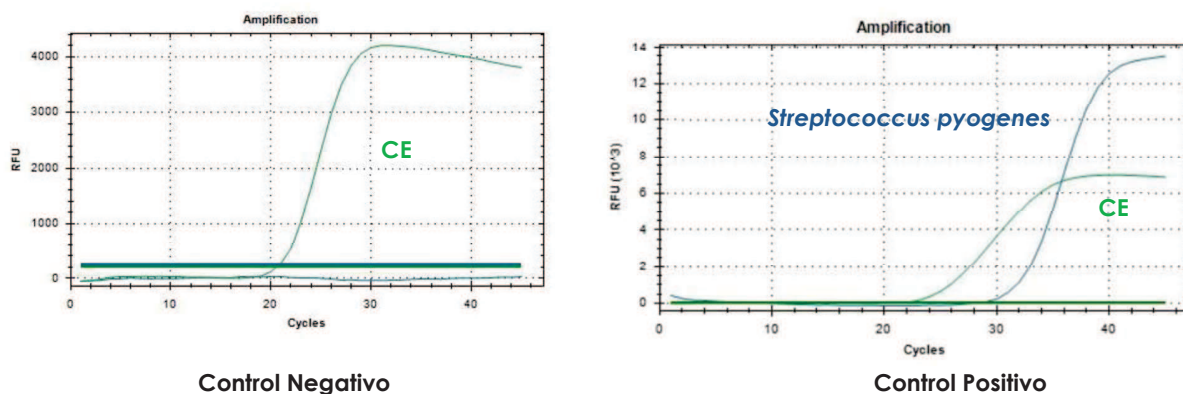
Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores. sin señal = sin curva de amplificación.

1 El control de extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. Se pueden observar diferencias en los valores de Ct en los controles de extracción entre los controles y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

2 En el caso de que los genes diana de *Streptococcus pyogenes* resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct ≥ 35 del control de extracción, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

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

Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras faríngeas y de exudado ótico recogido mediante hisopo.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Streptococcus pyogenes* ya sea a causa de muestras con una elevada concentración de DNA diana o por contaminación a causa de productos de la PCR de reacciones previas.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y Group A *Streptococcus* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA bacteriano durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de *Streptococcus pyogenes*.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de RT-qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de antibióticos utilizados para prevenir *Streptococcus pyogenes* o durante el tratamiento de la infección.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de bacterias viables y no implica que estos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias bacterianas diana (gen *speB*).
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.

11. Control de calidad

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) o el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Las evaluaciones clínicas de VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit se realizaron usando muestras clínicas (muestras faríngeas y de exudado ótico recogidas mediante hisopo) de pacientes con sospecha de infección respiratoria, realizando diferentes evaluaciones multicéntricas en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado:

	Lugar	Tipo de muestra	Proceso	Diana
1	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, España)	Muestras faríngeas	Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit utilizando COBAS® AmpliPrep/ Extractor de ácidos nucleicos MagLEAD® 12gC utilizando los reactivos MagDEA® Dx/ Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit e Invisorb® Spin Universal Kit + AriaMx Real-time PCR System/Applied BioSystem 7500 RT PCR System	<i>Streptococcus pyogenes</i>
2	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, España)	Muestras óticas	Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit utilizando COBAS® AmpliPrep/ Extractor de ácidos nucleicos MagLEAD® 12gC utilizando los reactivos MagDEA® Dx/ Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit e Invisorb® Spin Universal Kit + AriaMx Real-time PCR System/Applied BioSystem 7500 RT PCR System	<i>Streptococcus pyogenes</i>

Tabla 5. Lugar, muestra, proceso y diana.

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

Lugar	Ensayo Comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	<i>Streptococcus pyogenes</i> Real-TM Quant kit molecular assay.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	95	288	1	0	1 (0.96-1)	0.99 (0.98-1)	1 (0.96-1)	0.99 (0.98-1)
2	<i>Streptococcus pyogenes</i> Real-TM Quant kit molecular assay.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	15	7	0	0	1 (0.78-1)	1 (0.59-1)	1 (0.78-1)	1 (0.59-1)

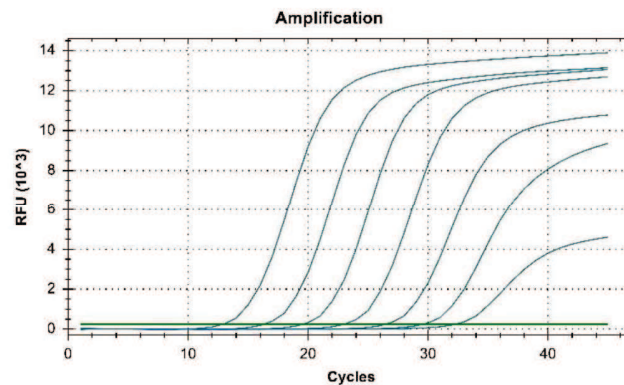
Tabla 6. Valores de verdadero positivo (TP) y negativo (TN), valores de falso positivo (FP) y falso negativo (FN), sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) para VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados muestran un alto nivel de concordancia para la detección de *Streptococcus pyogenes* utilizando VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección ≥ 10 copias genómicas por reacción para *Streptococcus pyogenes* (Figura 3).

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de *Streptococcus pyogenes* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo del *Streptococcus pyogenes* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Test de reactividad cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Human Adenovirus Types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-	Human Bocavirus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Legionella longbeache</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Respiratory Syncytial virus (RSV) A and B	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Human rhinovirus type C	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-				

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en el estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a *Streptococcus pyogenes* Rosenbach 1884, mostrando resultados positivos.

ANEXO 1

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-GAS106L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-GAS106H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GAS112L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GAS112H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-GAS113L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-GAS113H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS136
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS172
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-GAS101L
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-GAS101H
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS101

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón y polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	gen speB
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3, A1.4 y A1.5. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A1.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1/6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> P Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GAS101L, VS-GAS101H, VS-GAS106L, VS-GAS106H, VS-GAS112L y VS-GAS112H.

Reagent/Material	Description	Color	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GAS113L y VS-GAS113H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	TransparentE	9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1. 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GAS101, VS-GAS136 y VS-GAS172. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de Group A *Streptococcus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes.

Reconstituir el *Group A Streptococcus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

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

A1.3.2 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Group A Streptococcus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

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

Tabla A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Streptococcus pyogenes*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certets.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción para ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menu Select New Equipment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-GAS196T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	gen <i>speB</i>
Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Group A <i>Streptococcus</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GAS196T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de Group A *Streptococcus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir Group A *Streptococcus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a

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

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *Group A Streptococcus* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Group A Streptococcus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerTEST.es).

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

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

Tabla A3. 1. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Streptococcus pyogenes*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certets.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción para ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menu Select New Equipment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 3

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-GAS106LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-GAS106HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-GAS112LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-GAS112HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-GAS113LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-GAS113HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS136E
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS172E
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-GAS101LE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-GAS101HE
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-GAS101E

Tabla A3. 2. Referencias.

A3.1 Procedimiento

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

Diana	Canal	Gen
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	gen speB
Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A3. 3. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.3, A3.4 y A3.5. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla A3.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A3.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A3.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Group A <i>Streptococcus</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/6/12 tiras de 8-pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	1/6/12 tiras 8 tapones

Tabla A3. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GAS101LE, VS-GAS101HE, VS-GAS106LE, VS-GAS106HE, VS-GAS112LE y VS-GAS112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Group A <i>Streptococcus</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A3. 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GAS113LE y VS-GAS113HE.

Reactivo/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparent	2/9/18 tias de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Blue	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Red	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Green	1 vial
Negative control	Control negativo	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparent	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3. 6. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GAS101E, VS-GAS136E y VS-GAS172E. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el *Group A Streptococcus* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Group A Streptococcus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir el *Group A Streptococcus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

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

A3.3.3 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

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

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

Añadir 5 µL de *Group A Streptococcus* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de Datos*)	50 seg	60°C

Tabla A3. 7. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Streptococcus pyogenes*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certets.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción para ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Equipment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Group A <i>Streptococcus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-GAS196TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FAM	gen <i>speB</i>
Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A4. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.ceratest.es.

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

Reactivo/Material	Description	Colour	Amount
Group A <i>Streptococcus</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Group A <i>Streptococcus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A4. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Group A *Streptococcus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-GAS196TE.

A4.3 Procedimiento del test

A4.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el *Group A Streptococcus* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Group A Streptococcus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Group A Streptococcus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A4.3.4 Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *Group A Streptococcus* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

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

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

Añadir 5 µL de *Group A Streptococcus* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de Datos*)	50 seg	60°C

Tabla A4. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Streptococcus pyogenes*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certets.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción para ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menu Select New Equipment/Advanced Setup/Experiment Properties.

Bibliography/Bibliografía

1. Dunne EM *et al.* Detection of group a streptococcal pharyngitis by quantitative PCR. *BMC Infectious Diseases*. 2013 Jul 11;13:312. doi: 10.1186/1471-2334-13-312.
2. Felsenstein S *et al.* Molecular and Clinical Diagnosis of Group A Streptococcal Pharyngitis in Children. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014 Nov;52(11):3884-9. doi: 10.1128/JCM.01489-14.
3. Church DL *et al.* Evaluation of Simplexa Group A Strep Direct Kit Compared to Hologic Group A Streptococcal Direct Assay for Detection of Group A Streptococcus in Throat Swabs. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018 Feb 22;56(3). pii: e01666-17. doi: 10.1128/JCM.01666-17.

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

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

Trademarks

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

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

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	16/04/2021

Table A 5. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 16th April 2021

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01

