

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



P. aeruginosa, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis*

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 <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-PKP101L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- PKP101H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- PKP106L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- PKP106H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- PKP112L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- PKP112H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS- PKP113L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS- PKP113H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP101
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP136
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP172

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 <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS- PKP196T

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 <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- PKP101LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- PKP101HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- PKP106LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- PKP106HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- PKP112LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- PKP112HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS- PKP113LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS- PKP113HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP101E
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP136E
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP172E

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 <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS- PKP196TE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Content

1.	Intended use.....	8
2.	Summary and Explanation	8
3.	Principle of the procedure	9
4.	Reagents provided	9
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	9
6.	Transport and storage conditions.....	10
7.	Precautions for users	10
8.	Test procedure	12
8.1.	Specimen collection, transport and storage	12
8.2.	DNA extraction.....	12
9.	Result interpretation	13
9.1.	References with internal control (references in Annex 1 and 2)	13
9.2.	References with extraction control (references in Annex 3 and 4)	15
10.	Limitations of the test	17
11.	Quality control.....	18
12.	Performance characteristics.....	18
12.1.	Clinical sensitivity and specificity.....	18
12.2.	Analytical sensitivity	19
12.3.	Analytical specificity	20
12.4.	Analytical reactivity	22
	ANNEX 1	23
A1.1	Principle of the procedure.....	23
A1.2	Reagents provided.....	23
A1.3	Test procedure	25
A1.3.1	Lyophilized positive control.....	25
A1.3.2	PCR protocol.....	25
	ANNEX 2	26
A2.1	Principle of the procedure.....	26
A2.2	Reagents provided.....	26
A2.3	Test procedure	26
A2.3.1	Lyophilized positive control.....	26
A2.3.2	Lyophilized reaction mix tube.....	27
A2.3.3	PCR protocol.....	27
	ANNEX 3	28
A3.1	Principle of the procedure.....	28
A3.2	Reagents provided.....	28
A3.3	Test procedure	30
A3.3.1	Lyophilized extraction control	30
A3.3.2	Lyophilized positive control.....	30

A3.3.3 PCR protocol	30
ANNEX 4	32
A4.1 Principle of the procedure	32
A4.2 Reagents provided	32
A4.3 Test procedure	33
A4.3.1 Lyophilized extraction control	33
A4.3.2 Lyophilized positive control	33
A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube	33
A4.3.4 PCR protocol	33

Contenido

1. Uso previsto	35
2. Introducción y explicación	35
3. Procedimiento	35
4. Reactivos suministrados	36
5. Material requerido y no suministrado	36
6. Condiciones de transporte y almacenamiento	37
7. Precauciones para el usuario	38
8. Procedimiento del test	39
8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	39
8.2. Extracción de DNA	40
9. Interpretación de resultados	40
9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	40
9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	42
10. Limitaciones del test	44
11. Control de calidad	45
12. Características del test	46
12.1. Sensibilidad y especificidad clínica	46
12.2. Sensibilidad analítica	47
12.3. Especificidad analítica	48
12.4. Reactividad analítica	50
ANEXO 1	51
A1.1 Procedimiento	51
A1.2 Reactivos suministrados	51
A1.3 Procedimiento del test	53
A1.3.1 Control positivo liofilizado	53
A1.3.2 Protocolo PCR	53
ANEXO 2	54
A2.1 Procedimiento	54
A2.2 Reactivos suministrados	54
A2.3 Procedimiento del test	55

A2.3.1 Control positivo liofilizado	55
A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada	55
A2.3.3 Protocolo PCR	55
ANEXO 3.....	57
A3.1 Procedimiento	57
A3.2 Reactivos suministrados	57
A3.3 Procedimiento del test	59
A3.3.1 Control de extracción liofilizado	59
A3.3.2 Control positivo liofilizado	59
A3.3.3 Protocolo PCR	60
ANEXO 4.....	61
A4.1 Procedimiento	61
A4.2 Reactivos suministrados	61
A4.3 Procedimiento del test	62
A4.3.1 Control de extracción liofilizado	62
A4.3.2 Control positivo liofilizado	62
A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada	62
A4.3.4 Protocolo PCR	63
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	64
Trademarks.....	65

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit is designed for the qualitative detection and differentiation of DNA from *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* in blood culture and swab samples such as biopsy, gluteal swabs, ulcer swabs, wound swabs, tongue swab, joint fluid swab, oral swabs, hair swabs, perineal swab, urethral swab, abscess swabs and ostomy swab from patients with suspect of bacterial infection and/or multi-resistant infection or colonization and swabs specimens for epidemiological control such as nasal, pharyngeal, rectal swabs, axillary swabs, inguinal swabs, epithelial swabs, colostomy swabs, one stoma swab, BAS, BAL and sputum specimens by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* infection in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical samples, amplified using real time PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis*.

2. Summary and Explanation

Pseudomonas is a type of bacteria that is found commonly in the environment, like in soil and in water. Of the many different types of *Pseudomonas*, the one that most often causes infections in humans is *Pseudomonas aeruginosa* which is an opportunistic pathogen of the *Pseudomonadaceae* family that can cause infections in both immunocompetent and immunocompromised hosts. *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative, aerobic, non-spore forming rod that is capable of causing a variety of infections.

Pseudomonas aeruginosa lives in the environment and can be spread to people in healthcare settings when they are exposed to water or soil that is contaminated with these germs. Resistant strains of the germ can also spread in healthcare settings from one person to another through contaminated hands, equipment, or surfaces.

Klebsiella pneumoniae belongs to the *Enterobacteriaceae* family and is described as a gram-negative, encapsulate, and non-motile bacterium. Virulence of the bacterium is provided by a wide array of factors that can lead to infection and antibiotic resistance. The polysaccharide capsule of the organism is the most important virulence factor and allows the bacteria to evade opsonophagocytosis and serum killing by the host organism. A second virulence factor is lipopolysaccharides that coat the outer surface of a gram-negative bacteria. The sensing of lipopolysaccharides releases an inflammatory cascade in the host organism and has been a major culprit of the sequela in sepsis and septic shock. Another virulence factor, fimbriae, allows the organism to attach itself to host cells. Siderophores are another virulence factor that is needed by the organism to cause infection in hosts. Siderophores acquire iron from the host to allow propagation of the infecting organism.

Klebsiella pneumoniae is one of a handful of bacteria that are now experiencing a high rate of antibiotic resistance secondary to alterations in the core genome of the organism.

Proteus mirabilis, part of the *Enterobacteriaceae* family of bacilli, is a gram-negative, facultative anaerobe with an ability to ferment maltose and inability to ferment lactose. *P. mirabilis* also has swarming motility and the ability to self-elongate and secrete a polysaccharide when in contact with solid surfaces; this allows for attachment and easy motility along surfaces (e.g., like catheters, intravenous lines, and other medical equipment). The flagella of *P.*

mirabilis are what allow for its motility; not only does this help support colonization, but it also has been associated with its ability to form biofilms and is suggested to contribute to resistance to host defences and certain antibiotics.

3. Principle of the procedure

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* infection in clinical samples from patients with suspect of bacterial infection and/or multi-resistant infection or colonization and clinical samples for epidemiological control. After DNA isolation, the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* is performed by the amplification of a conserved region of the *oprL* gene for *Pseudomonas aeruginosa*; *Hemolysin* gene for *Klebsiella pneumoniae* and *hns* gene for *Proteus mirabilis*, using specific primers and fluorescent-labelled probes.

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 verify the correct functioning of the amplification mix.

4. Reagents provided

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tube format (Annex 2 and 4).
- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: -30°C to -10°C and/or ≤ -70°C.
- Centrifuge for 1.5mL tubes and PCR well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipetes (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).

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: VIASURE V-Lab96 Cyclor (CerTest Biotec S.L.), 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), Rotor-Gene® Q (Qiagen), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor (DNA-Technology), DTlite Real-time Detection Thermal Cyclor (DNA-Technology), Cobas z 480 Analyzer (Roche Molecular Diagnosis) and CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR System (Bio-Rad).

To check thermocyclor compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

Optical measurement parameters of some thermocyclors 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 Cyclor (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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocyclor) 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-PKP113L, VS-PKP113H, VS-PKP136, VS-PKP172, VS-PKP113LE, VS-PKP113HE, VS-PKP136E and VS-PKP172E). 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-PKP101, VS-PKP136 and VS-PKP172, VS-PKP101E, VS-PKP136E and VS-PKP172E (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 colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
 - Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
 - In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipment required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
 - Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles, and mask. Do not eat, drink, 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 do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because they do 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit has been tested in blood culture and samples from patients with suspect of bacterial infection and/or multi-resistant infection or colonization and swabs for epidemiological control such as biopsy, gluteal, ulcer, wound, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, ostomy, nasal, pharyngeal, rectal, axillary, inguinal epithelial, colostomy and stoma swabs; BAS, BAL and sputum. Swab specimens have been collected in AMIES transport medium (DeltaLab). 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, clinical 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 Room Temperature (RT) for up to 2 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 2 hours). It is recommended shipping at -80°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored frozen at -20°C or ideally at -80°C for conservation (if medium allow it). Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. DNA extraction

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

Due to VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit is also available with extraction control (references include in Annexes 3 and 4), if the Extraction Control (EC) is used to monitor nucleic acid isolation and as PCR inhibition control, add 5µL of the reconstituted EC to the specimen and/or lysis buffer mixture (clinical specimen, as well as positive control and/or negative control). Close each tube and vortex for 10 seconds. If the Extraction Control is used only as a PCR inhibition control, 1µL of the reconstituted EC should be added to the reconstituted Reaction-Mix.

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

- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).

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.

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

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* in the positive control well.

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

(ROX) ¹ Controls	<i>oprL</i> gene (FAM) ¹	Hemolysin gene (ROX) ¹	<i>hns</i> gene (Cy5) ¹	Internal Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curves.

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 analyse the results:

(Cy5) <i>P. aeruginosa</i> (<i>oprL</i> gene) (FAM)	<i>K. pneumoniae</i> (Hemolysin gene) (ROX)	<i>P. mirabilis</i> (<i>hns</i> gene) (Cy5)	Internal control (HEX)	Interpretation for patient's individual samples	
≤37	≤35	>35 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. aeruginosa</i> and <i>K. pneumoniae</i> DNA Detected
≤37	>35 or no signal	>35 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. aeruginosa</i> DNA Detected
>37 or no signal	≤35	>35 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>K. pneumoniae</i> DNA Detected
>37 or no signal	>35 or no signal	≤35	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. mirabilis</i> DNA Detected
≤37	>35 or no signal	≤35	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. aeruginosa</i> and <i>P. mirabilis</i> DNA Detected
≤37	≤35	≤35	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> and <i>P. mirabilis</i> DNA Detected
>37 or no signal	≤35	≤35	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>K. pneumoniae</i> and <i>P. mirabilis</i> DNA Detected
>37 or no signal	>35 or no signal	>35 or no signal	≤35 ²	Valid	Targets not Detected ²
>37 or no signal	>35 or no signal	>35 or no signal	>35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing ²

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

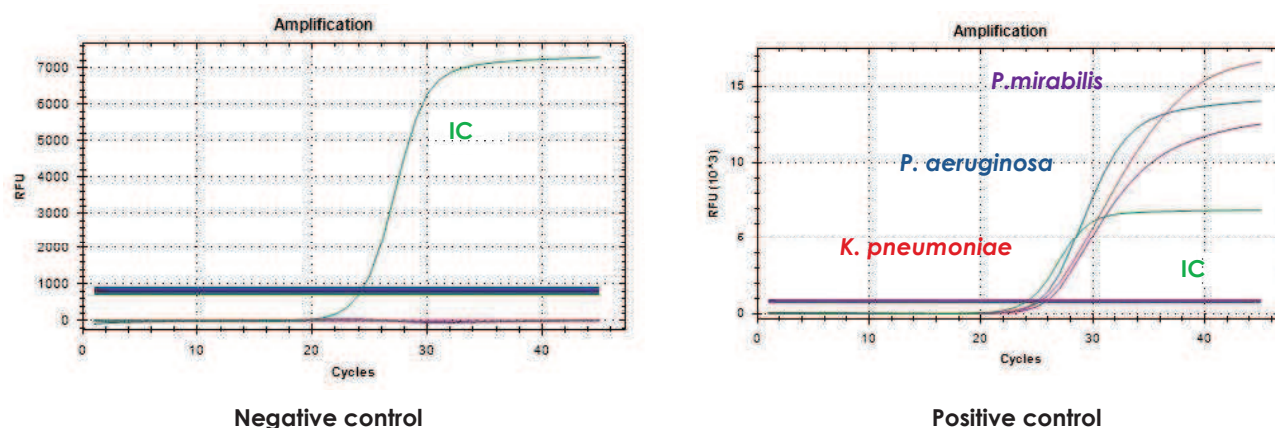
1 The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 In the case of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* target genes negative, IC must show an amplification signal with Ct ≤ 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 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 qPCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- obtain a new specimen and retest.

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



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

All the results 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.

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

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* in the positive control well. For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	<i>oprL</i> gene (FAM) ¹	Hemolysin gene (ROX) ¹	<i>hns</i> gene (Cy5) ¹	Extraction Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 3. Expected performance of controls. Ct values. no signal = no amplification curves.

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).

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>P. aeruginosa</i> (<i>oprL</i> gene) (FAM)	<i>K. pneumoniae</i> (Hemolysin gene) (ROX)	<i>P. mirabilis</i> (<i>hns</i> gene) (Cy5)	<i>P. aeruginosa</i> (<i>oprL</i> gene) (FAM)	Interpretation for patient's individual samples	
≤37	≤35	>35 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. aeruginosa</i> and <i>K. pneumoniae</i> DNA Detected
≤37	>35 or no signal	>35 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. aeruginosa</i> DNA Detected
>37 or no signal	≤35	>35 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>K. pneumoniae</i> DNA Detected
>37 or no signal	>35 or no signal	≤35	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. mirabilis</i> DNA Detected
≤37	>35 or no signal	≤35	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. aeruginosa</i> and <i>P. mirabilis</i> DNA Detected
≤37	≤35	≤35	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> and <i>P. mirabilis</i> DNA Detected
>37 or no signal	≤35	≤35	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>K. pneumoniae</i> and <i>P. mirabilis</i> DNA Detected
>37 or no signal	>35 or no signal	>35 or no signal	≤35 ²	Valid	Targets not Detected ²
>37 or no signal	>35 or no signal	>35 or no signal	>35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing ²

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

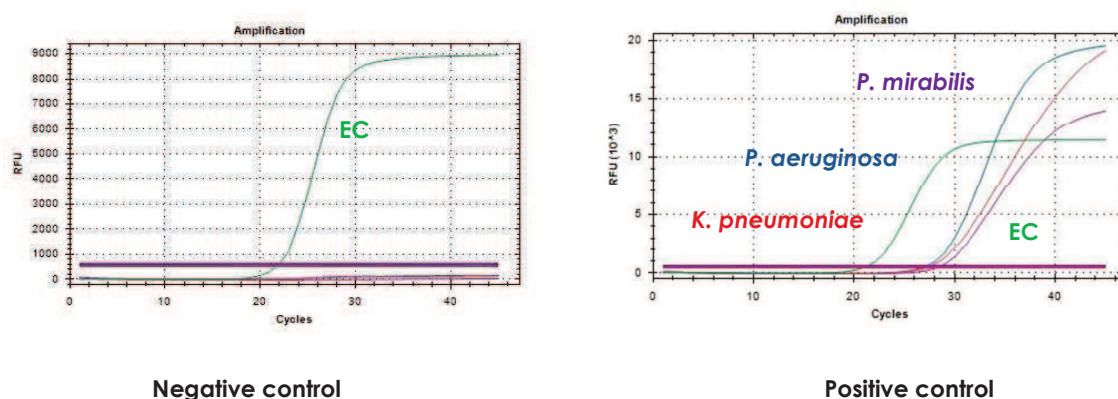
1 The Extraction Control (EC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids. Differences can be observed in the values of Ct in the extraction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

2 In the case of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* target genes negative, EC must show an amplification signal with Ct ≤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 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 qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- a) repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- c) obtain a new specimen and retest.

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



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 blood culture and swab samples such as biopsy, gluteal, ulcer, wound, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, ostomy, nasal, pharyngeal, rectal, axillary, inguinal epithelial, colostomy and stoma swabs; BAS, BAL and sputum.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and/or *P. mirabilis*, 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 by *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* strains.
 - A bacterial load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of 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 bacteria sequences.
- Negative results do not preclude by *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak bacterial levels during infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the pathogen.
- If diagnostic tests for other bacterial infection are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit was tested using clinical samples from patients with suspected of bacterial 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 are included in the following table. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Hospital Royo Villanova (Zaragoza, Spain).	Blood cultures	MagDEA Dx SV kit using the automated MagLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology).	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
				<i>Klebsiella pneumoniae</i>
				<i>Proteus mirabilis</i>
2	Hospital Royo Villanova (Zaragoza, Spain).	Swab samples*	MagDEA Dx SV kit using the automated MagLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology).	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
				<i>Klebsiella pneumoniae</i>
				<i>Proteus mirabilis</i>
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

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

* Swabs samples such as biopsy, gluteal, ulcer, wound, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, ostomy, nasal, pharyngeal, rectal, axillary, inguinal epithelial, colostomy and stoma swabs; BAS, BAL and sputum.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	Culture	<i>P. aeruginosa</i>	5	412	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.99-1)	1 (0.56-1)	1 (0.99-1)
		<i>K. pneumoniae</i>	22	395	0	0	1 (0.84-1)	1 (0.99-1)	1 (0.84-1)	1 (0.99-1)
		<i>P. mirabilis</i>	20	397	0	0	1 (0.83-1)	1 (0.99-1)	1 (0.83-1)	1 (0.99-1)
	"Magicplex™ Sepsis ID4 Real-time Detection" (Seegene)/ "Magicplex™ Sepsis ID6 Real-time Detection" (Seegene)	<i>P. aeruginosa</i>	5	18	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.81-1)	1 (0.47-1)	1 (0.81-1)
		<i>K. pneumoniae</i>	22	21	0	0	1 (0.84-1)	1 (0.83-1)	1 (0.84-1)	1 (0.83-1)
		<i>P. mirabilis</i>	20	22	0	0	1 (0.83-1)	1 (0.84-1)	1 (0.83-1)	1 (0.84-1)
2	Culture	<i>P. aeruginosa</i>	132	486	0	2	0.98 (0.94-0.99)	1 (0.99-1)	1 (0.96-1)	0.99 (0.98-0.99)
		<i>K. pneumoniae</i>	122	498	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
		<i>P. mirabilis</i>	35	585	0	0	1 (0.90-1)	1 (0.99-1)	1 (0.90-1)	1 (0.99-1)

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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit.

Results show high agreement to detect *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* using VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of 0.8 CFU per reaction for *Pseudomonas aeruginosa*, 0.01 CFU per reaction for *Klebsiella pneumoniae* and 0.04 CFU per reaction for *Proteus mirabilis*, with a positive rate of 95%.

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

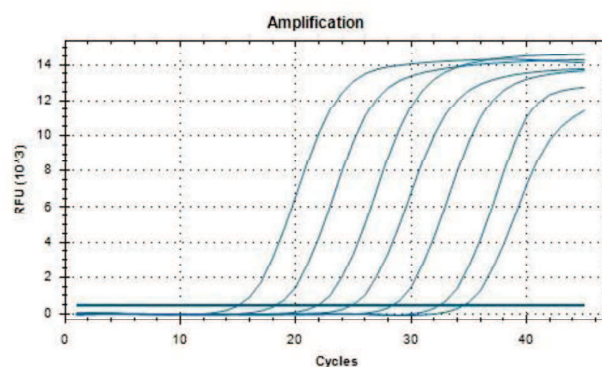


Figure 4. Dilution series of *Hemolysin* gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel ROX).

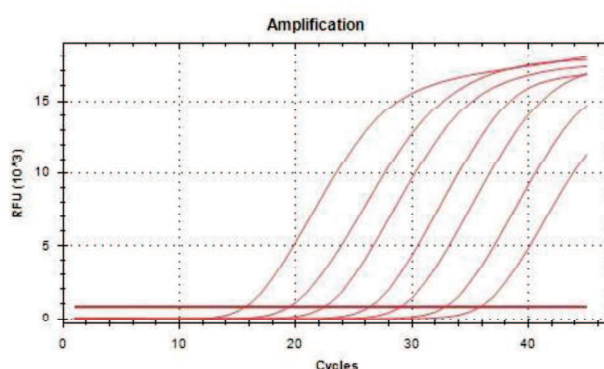
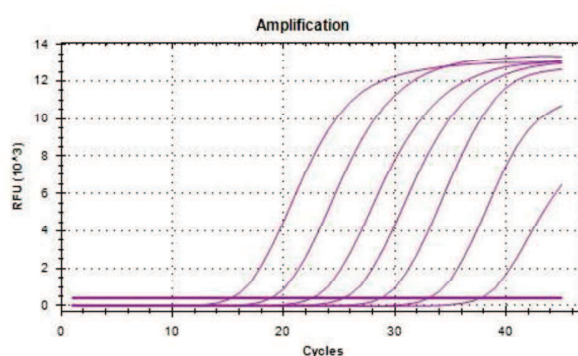


Figure 5. Dilution series of *hns* gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel Cy5).



12.3. Analytical specificity

The specificity of VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms associated to gastrointestinal diseases and/or blood transmission. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing (wet testing)					
Human Adenovirus type 1,2, 3, 4, 5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Dengue virus type 1 strain Hawaii A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®10145™	+/-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	Dengue virus type 2 strain New Guinea C	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	-	Dengue virus type 3 strain H87	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-
<i>Anaplasma marginale</i>	-	Dengue virus type 4 strain H241	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41	-
Astrovirus genotype I-VIII	-	<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar enteritidis	-

<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>gallinarum</i>	-
<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi</i> A	-
<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi</i> B	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>pullorum</i>	-
<i>Borrelia bisetti</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhi</i>	-
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> serotype O25:H42	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> . Serotype 4,5,12:i:1,2	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	Enterovirus 68 and 71	-	Sapovirus	-
<i>Borrelia garinii</i>	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
		Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	St Louis Encephalitis Virus	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> J99	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Human Rotavirus A	-	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	Japanese encephalitis	-	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorfl	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	Japanese encephalitis virus strain Nakayama	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> serotype capsular 2 (CECT141)	-/+	Usutu Virus	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	-/+	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NDM-1 resistant) ATCC®BAA-2146™	+/-	West Nile virus strain Heja	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (OXA-48 resistant) (ATCC® BAA-2524™)	+/-	West Nile virus strain NY99	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC®10031™	+/-	West Nile virus strain Ug 37	-
Chikungunya Virus F24	-	<i>Leptospira</i>	-	Yellow Fever Virus strain 17D	-
Chikungunya Virus Martinique	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c	-	Yellow Fever Virus strain French Neurotropic	-
Chikungunya virus S27 Petersfield	-	Norovirus GI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-

Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	Norovirus GII. 4RNA	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-	Zika Virus African strain	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC®25933™	+/-	Zika Virus Asian strain PF13/251013-18	-
<i>Clostridium difficile</i> O:27	-	<i>Proteus mirabilis</i> (CECT 170)	+/-	Zika Virus French Polynesian strain 11468/16	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	Zika Virus French Polynesian strain 11474/16	-
<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CECT 108)	+/-	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-				

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit for *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated against DNA extracted from *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 10145™) and *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 108) (as templates), showing positive results.

The reactivity of VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit for *Klebsiella pneumoniae* was evaluated against DNA extracted from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC® 10031™), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Serotype capsular 2 (CECT 141), *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 reference strain (ATCC® BAA-2146™) and *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* carbapenemase producer (OXA-48) (ATCC® BAA-2524™) (as templates), showing positive results.

The reactivity of VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit for *Proteus mirabilis* was evaluated against DNA extracted from *Proteus mirabilis* (ATCC® 25933™) and *Proteus mirabilis* (CECT 170) (as templates), showing positive results.

ANNEX 1

OPEN FORMAT AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- PKP101L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- PKP101H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- PKP106L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- PKP106H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- PKP112L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- PKP112H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS- PKP113L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS- PKP113H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP101
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP136
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP172

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	<i>oprL</i> gene
<i>Proteus mirabilis</i>	Cy5	<i>hns</i> gene
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ROX	<i>Hemolysin</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.cerfest.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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.cerTEST.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-PKP101L, VS-PKP101H, VS- PKP106L, VS-PKP106H, VS-PKP112L and VS-PKP112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-PKP113L and VS-PKP113H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control 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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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	2/9/18 X 4-cap strip

Table A1 5. Reagents and materials provided in VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-PKP101, VS-PKP136 and VS-PKP172. 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

P. aeruginosa, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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	Initial denaturation	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 (*oprL* gene), ROX (*Hemolysin* gene), Cy5 (*hns* gene) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS- PKP196T

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	<i>oprL</i> gene
<i>Proteus mirabilis</i>	Cy5	<i>hns</i> gene
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ROX	<i>Hemolysin</i> 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.cerfex.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS- PKP196T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

P. aeruginosa, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. 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	Initial denaturation	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 (*oprL* gene), ROX (*Hemolysin* gene), Cy5 (*hns* gene) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 3

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- PKP101LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- PKP101HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- PKP106LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- PKP106HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- PKP112LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- PKP112HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS- PKP113LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS- PKP113HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP101E
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP136E
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP172E

Table A3. 1. References.

A3.1 Principle of the procedure

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	<i>oprL</i> gene
<i>Proteus mirabilis</i>	Cy5	<i>hns</i> gene
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ROX	<i>Hemolysin</i> gene
Extraction control (EC)	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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-PKP101LE, VS-PKP101HE, VS-PKP106LE, VS-PKP106HE, VS-PKP112LE and VS-PKP112HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-PKP113LE and VS-PKP113HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/9/18 X 4-cap strip

Table A3 5. Reagents and materials provided in VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-PKP101E, VS-PKP136E and VS-PKP172E. 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 reconstituting the lyophilized *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Positive Control in an area away from the other components.

A3.3.2 Lyophilized positive control

P. aeruginosa, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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	Initial denaturation	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 (*oprL* gene), ROX (*Hemolysin* gene), Cy5 (*hns* gene) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 4

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-PKP196TE

Table A4. 1. References.

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	<i>oprL</i> gene
<i>Proteus mirabilis</i>	Cy5	<i>hns</i> gene
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ROX	Hemolysin gene
Extraction control (EC)	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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A4.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-PKP196TE.

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 reconstituting the lyophilized *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Positive Control in an area away from the other components.

A4.3.2 Lyophilized positive control

P. aeruginosa, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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	Initial denaturation	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 (*oprL* gene), ROX (*Hemolysin* gene), Cy5 (*hns* gene) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa de DNA de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis* en hemocultivo y muestras de hisopos como por ejemplo biopsia, hisopos de glúteos, hisopos de úlceras, hisopos de heridas, hisopos de lengua, hisopos de líquido articular, hisopos orales, hisopos de cabello, hisopos perineales, hisopos uretrales, hisopos de abscesos e hisopos de ostomía de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección multirresistente o colonización e hisopados para control epidemiológico como hisopos nasales, faríngeos, rectales, hisopos axilares, hisopos inguinales, hisopos epiteliales, hisopos de colostomía, hisopos de un estoma, BAS, BAL y esputos por su profesional de la salud. Esta prueba está destinada a ser usada como ayuda en el diagnóstico de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis* en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de muestras clínicas y se amplifica mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo mediante el uso de oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher) para detectar *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis*.

2. Introducción y explicación

Pseudomonas es un tipo de bacteria que se encuentra comúnmente en el medio ambiente, como en el suelo y en el agua. De los muchos tipos diferentes de *Pseudomonas*, el que con mayor frecuencia causa infecciones en humanos es *Pseudomonas aeruginosa*, que es un patógeno oportunista de la familia *Pseudomonadaceae* que puede causar infecciones tanto en huéspedes inmunocompetentes como inmunocomprometidos. *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gramnegativo, aeróbico, que no forma esporas y es capaz de causar una variedad de infecciones.

Pseudomonas aeruginosa vive en el medio ambiente y se puede transmitir a las personas en entornos de atención médica cuando están expuestas al agua o al suelo que está contaminado con estos gérmenes. Las cepas resistentes del germen también pueden propagarse en entornos de atención médica de una persona a otra a través de manos, equipos o superficies contaminadas.

Klebsiella pneumoniae pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se describe como una bacteria gramnegativa, encapsulada e inmóvil. La virulencia de la bacteria es proporcionada por una amplia gama de factores que pueden conducir a la infección y la resistencia a los antibióticos. La cápsula de polisacáridos del organismo es el factor de virulencia más importante y permite que las bacterias eludan la opsonofagocitosis y la eliminación del suero por parte del organismo huésped. Un segundo factor de virulencia son los lipopolisacáridos que recubren la superficie exterior de una bacteria gramnegativa. La detección de lipopolisacáridos libera una cascada inflamatoria en el organismo huésped y ha sido uno de los principales culpables de las secuelas de sepsis y shock séptico. Otro factor de virulencia, las fimbrias, permite que el organismo se adhiera a las células huésped. Los sideróforos son otro factor de virulencia que el organismo necesita para causar infección en los huéspedes. Los sideróforos adquieren hierro del huésped para permitir la propagación del organismo infectante.

Klebsiella pneumoniae es una de las pocas bacterias que ahora están experimentando una alta tasa de resistencia a los antibióticos secundaria a alteraciones en el genoma central del organismo.

Proteus mirabilis, parte de la familia de bacilos *Enterobacteriaceae*, es un anaerobio facultativo gramnegativo con capacidad para fermentar maltosa e incapacidad para fermentar lactosa. *P. mirabilis* también tiene motilidad de enjambre y la capacidad de autoalargarse y secretar un polisacárido cuando entra en contacto con superficies sólidas; esto permite la unión y la motilidad fácil a lo largo de las superficies (p. ej., como catéteres, vías intravenosas y otros equipos médicos). Los flagelos de *P. mirabilis* son los que permiten su motilidad; esto no solo ayuda a apoyar la colonización, sino que también se ha asociado con su capacidad para formar biopelículas y se sugiere que contribuye a la resistencia a las defensas del huésped y a ciertos antibióticos.

3. Procedimiento

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis* en muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección multirresistente o colonización e hisopados para control epidemiológico. Después del aislamiento del DNA, la detección de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis* se lleva a cabo mediante la amplificación de las regiones conservadas del gen *oprL* para de *Pseudomonas aeruginosa*, del gen *Hemolysin* para *Klebsiella pneumoniae* y del gen *hns* para for *Proteus mirabilis*, utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado, así como un **control interno** con el que verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).

- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: -30°C a -10°C y/o $\leq$ -70°C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 μ L, 20-200 μ L).
- 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).

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: VIASURE V-Lab96 Cyclers (CerTest Biotec S.L.), 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), Rotor-Gene® Q (Qiagen), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), DTlite Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), Cobas z 480 Analyzer (Roche Molecular Diagnosis) y CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR System (Bio-Rad).

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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Reaction-Mix ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C $\pm$ 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-PKP113L, VS-PKP113H, VS-PKP136, VS-PKP172, VS-PKP113LE, VS-PKP113HE, VS-PKP136E y VS-PKP172E). 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-PKP101, VS-PKP136 and VS-PKP172, VS-PKP101E, VS-PKP136E y VS-PKP172E (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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad debido a que se clasifican 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) n° 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en muestras de hemocultivos y muestras de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección multirresistente o colonización e hisopados para control epidemiológico como hisopado de biopsia, glúteo, úlcera, herida, lengua, líquido articular, oral, capilar, perineal, uretral, absceso, ostomía, nasal, faríngea, rectal, axilar, epitelial inguinal, colostomía y estoma; BAS, BAL y esputo. Las muestras de hisopos han sido recolectadas en el medio de transporte AMIES (DeltaLab). 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 clínicas 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 a temperatura ambiente hasta 2 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 2 horas, se recomienda realizar el envío a -80°C o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse congeladas a -20°C o idealmente a -80°C °C para su conservación durante un tiempo prolongado (si el medio lo permite). Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94) y García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. 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.

Debido a que VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit está también disponible con control de extracción (las referencias se incluyen en los Anexos 3 y 4), si el control de extracción (EC) se usa para monitorear el aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de inhibición de la PCR, agregue 5µl del CE reconstituido a la muestra y/o mezcla de tampón de lisis (muestra clínica, así como al control positivo y/o control negativo). Cierre cada tubo y agite en el vórtex durante 10 segundos. Si el control de extracción se usa solo como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1µl del CE reconstituido a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas, 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, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).

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. Compruebe 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.

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

El uso de controles positivos y negativos en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* en el pocillo de control positivo.

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

Controles	Gen <i>oprL</i> (FAM) ¹	Gen <i>Hemolysin</i> (ROX) ¹	Gen <i>hns</i> (Cy5) ¹	Control Interno (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	≤40	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles. Ct valores. sin señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "no válidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control Interno (CI) 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>P. aeruginosa</i> (<i>oprL</i> gene) (FAM)	<i>K. pneumoniae</i> (<i>Hemolysin</i> gene) (ROX)	<i>P. mirabilis</i> (<i>hns</i> gene) (Cy5)	Control Interno (HEX)	Interpretación de muestras individuales de pacientes	
≤37	≤35	>35 o sin señal	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> Detectado
≤37	>35 o sin señal	>35 o sin señal	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> Detectado
>37 o sin señal	≤35	>35 o sin señal	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>K. pneumoniae</i> Detectado
>37 o sin señal	>35 o sin señal	≤35	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. mirabilis</i> Detectado
≤37	>35 o sin señal	≤35	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. mirabilis</i> DNA Detectado
≤37	≤35	≤35	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>P. mirabilis</i> Detectado
>37 o sin señal	≤35	≤35	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>K. pneumoniae</i> y <i>P. mirabilis</i> Detectado
>37 o sin señal	>35 o sin señal	>35 o sin señal	≤35 ²	Válido	Dianas no detectadas ²
>37 o sin señal	>35 o sin señal	>35 o sin señal	>35 o sin señal ¹	Válido	Test Fallido- Repetir test ²

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

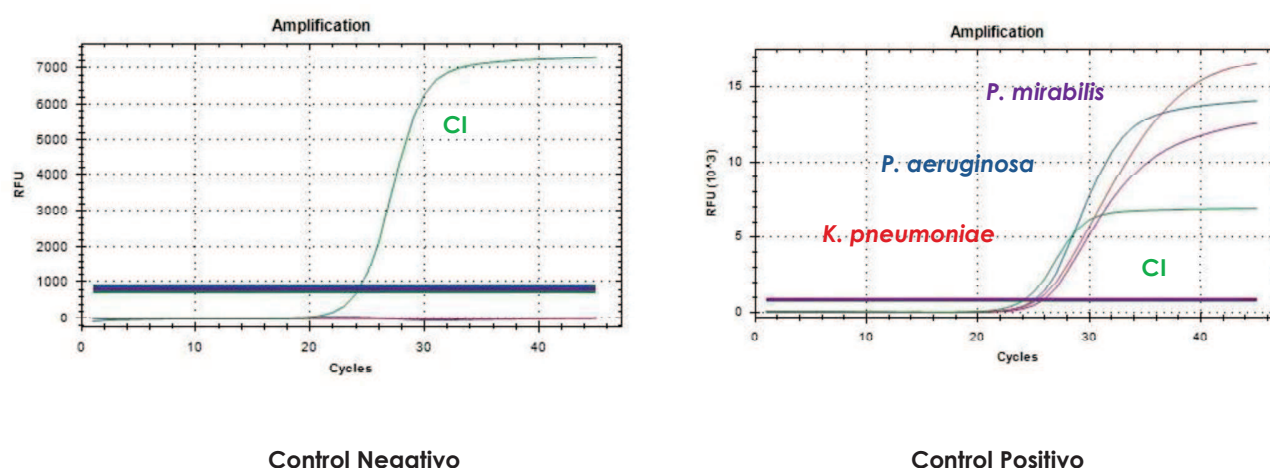
1 El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación ($C_t \leq 40$ o no señal). En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

2 En el caso de que los genes diana de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con $C_t \leq 35$. En el caso de ausencia de señal o valor de $C_t > 35$ del control interno, el resultado se considera "no válido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de 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 qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

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



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. Compruebe 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.

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

El uso de controles positivos y negativos en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* en el pocillo de control positivo.

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

Controles	<i>oprL</i> gene (FAM) ¹	Hemolysin gene (ROX) ¹	<i>hns</i> gene (Cy5) ¹	Control de Extracción (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	≤40	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Ct valores. sin señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "no válidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de extracción (CE) 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>P. aeruginosa</i> (<i>oprL</i> gene) (FAM)	<i>K. pneumoniae</i> (Hemolysin gene) (ROX)	<i>P. mirabilis</i> (<i>hns</i> gene) (Cy5)	Control de Extracción (HEX)	Interpretación de muestras individuales de pacientes	
≤37	≤35	>35 o sin señal	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> Detectado
≤37	>35 o sin señal	>35 o sin señal	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> Detectado
>37 o sin señal	≤35	>35 o sin señal	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>K. pneumoniae</i> Detectado
>37 o sin señal	>35 o sin señal	≤35	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. mirabilis</i> Detectado
≤37	>35 o sin señal	≤35	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. mirabilis</i> DNA Detectado
≤37	≤35	≤35	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>P. mirabilis</i> Detectado
>37 o sin señal	≤35	≤35	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>K. pneumoniae</i> y <i>P. mirabilis</i> Detectado
>37 o sin señal	>35 o sin señal	>35 o sin señal	≤35 ²	Válido	Dianas no detectadas ²
>37 o sin señal	>35 o sin señal	>35 o sin señal	>35 o sin señal ¹	Válido	Test Fallido- Repetir test ²

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

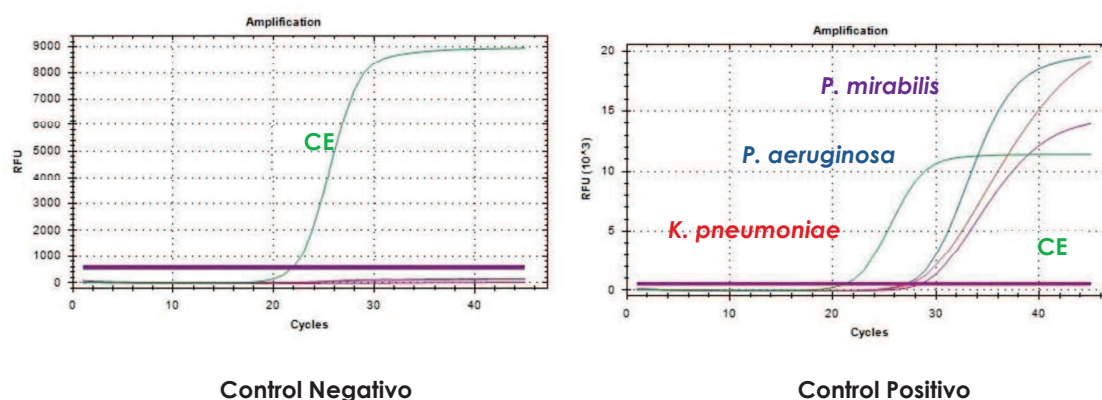
1 El control de extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación ($C_t \leq 40$ o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. Se pueden observar diferencias en los valores de C_t 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con $C_t \leq 35$. En el caso de ausencia de señal o valor de $C_t > 35$ del control de extracción, el resultado se considera "no válido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de 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 qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

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



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 hemocultivo y muestras de hisopos de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección multirresistente o colonización e hisopos para control epidemiológico como hisopado de biopsia, glúteo, úlcera, herida, lengua, líquido articular, oral, capilar, perineal, uretral, absceso, ostomía, nasal, faríngea, rectal, axilar, epitelial inguinal, colostomía y estoma; BAS, BAL y esputo.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.

- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y/o *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 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 cepas nuevas o desconocidas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis*.
 - Una carga bacteriana en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de los antibióticos utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma.
 - 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 estas bacterias sean infecciosas 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.
- Resultados negativos no excluyen padecer infección *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis*, y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga bacteriana durante las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis*. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar la/las bacterias.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras infecciones bacterianas son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis*, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.

11. Control de calidad

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el

control interno (CI) o el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y especificidad clínica de VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit fueron evaluadas utilizando muestras clínicas (hemocultivos e hisopos para control epidemiológico) de pacientes con sospecha de infección bacteriana. Para determinar la precisión del diagnóstico clínico se han realizado diferentes evaluaciones multicéntricas en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de los sitios, el tipo de muestra y el flujo de trabajo:

	Lugar	Tipo de muestra	Proceso	Diana
1	Hospital Royo Villanova (Zaragoza, Spain).	Hemocultivo	MagDEA Dx SV kit utilizando el equipo automático MagLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology).	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
				<i>Klebsiella pneumoniae</i>
				<i>Proteus mirabilis</i>
2	Hospital Royo Villanova (Zaragoza, Spain).	Muestras de hisopos*	MagDEA Dx SV kit utilizando el equipo automático MagLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology).	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
				<i>Klebsiella pneumoniae</i>
				<i>Proteus mirabilis</i>
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabla 5. Lugar, muestras, proceso y diana.

* Muestras de hisopado de biopsia, glúteo, úlcera, herida, lengua, líquido articular, oral, capilar, perineal, uretral, absceso, ostomía, nasal, faríngea, rectal, axilar, epitelial inguinal, colostomía y estoma; BAS, BAL y esputo.

Los verdaderos valores positivos y negativos, los valores de falsos positivos y negativos, la sensibilidad, especificidad, PPV, NPV para VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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	Cultivo	<i>P. aeruginosa</i>	5	412	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.99-1)	1 (0.56-1)	1 (0.99-1)
		<i>K. pneumoniae</i>	22	395	0	0	1 (0.84-1)	1 (0.99-1)	1 (0.84-1)	1 (0.99-1)
		<i>P. mirabilis</i>	20	397	0	0	1 (0.83-1)	1 (0.99-1)	1 (0.83-1)	1 (0.99-1)
	"Magicplex™ Sepsis ID4 Real-time Detection" (Seegene)/ "Magicplex™ Sepsis ID6 Real-time Detection" (Seegene)	<i>P. aeruginosa</i>	5	18	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.81-1)	1 (0.47-1)	1 (0.81-1)
		<i>K. pneumoniae</i>	22	21	0	0	1 (0.84-1)	1 (0.83-1)	1 (0.84-1)	1 (0.83-1)
		<i>P. mirabilis</i>	20	22	0	0	1 (0.83-1)	1 (0.84-1)	1 (0.83-1)	1 (0.84-1)
2	Cultivo	<i>P. aeruginosa</i>	132	486	0	2	0.98 (0.94-0.99)	1 (0.99-1)	1 (0.96-1)	0.99 (0.98-0.99)
		<i>K. pneumoniae</i>	122	498	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
		<i>P. mirabilis</i>	35	585	0	0	1 (0.90-1)	1 (0.99-1)	1 (0.90-1)	1 (0.99-1)

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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados muestran un alto nivel de concordancia para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis* utilizando VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de 0.8 CFU por reacción para *Pseudomonas aeruginosa*, 0.01 CFU por reacción para *Klebsiella pneumoniae* y de 0.04 CFU por reacción para *Proteus mirabilis*, con una tasa de positividad del 95%.

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

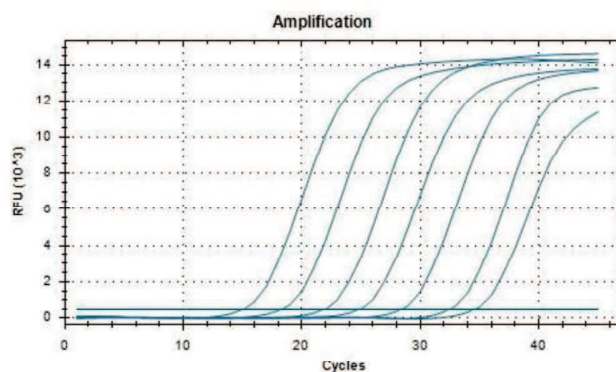


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar del gen *Hemolysin* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal ROX).

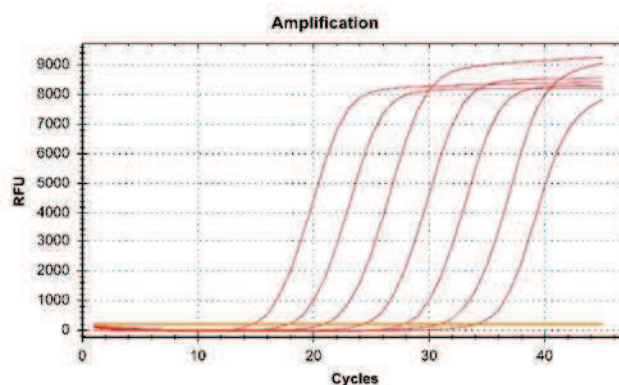
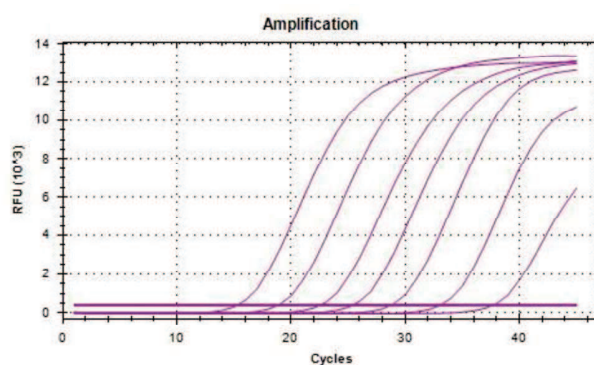


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar del gen *hns* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal Cy5).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad de VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos asociados a enfermedades gastrointestinales y/o transmisión sanguínea. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Reactividad cruzada					
Human Adenovirus type 1,2, 3, 4, 5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Dengue virus type 1 strain Hawaii A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®10145™	+/-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	Dengue virus type 2 strain New Guinea C	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	-	Dengue virus type 3 strain H87	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-
<i>Anaplasma marginale</i>	-	Dengue virus type 4 strain H241	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41	-
Astrovirus genotype I-VIII	-	<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar enteritidis	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar gallinarum	-
<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar paratyphi A	-
<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar paratyphi B	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar pullorum	-
<i>Borrelia bisetti</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar typhi	-
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> serotype O25:H42	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar typhimurium. Serotype 4,5,12:i:1,2	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	Enterovirus 68 and 71	-	Sapovirus	-
<i>Borrelia garinii</i>	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
		Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	St Louis Encephalitis Virus	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> J99	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Human Rotavirus A	-	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	Japanese encephalitis	-	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorfl	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	Japanese encephalitis virus strain Nakayama	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> serotype capsular 2 (CECT141)	-/+	Usutu Virus	-

<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	-/+	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NDM-1 resistant) ATCC®BAA-2146™	+/-	West Nile virus strain Heja	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (OXA-48 resistant) (ATCC® BAA-2524™)	+/-	West Nile virus strain NY99	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC®10031™	+/-	West Nile virus strain Ug 37	-
Chikungunya Virus F24	-	<i>Leptospira</i>	-	Yellow Fever Virus strain 17D	-
Chikungunya Virus Martinique	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c	-	Yellow Fever Virus strain French Neurotropic	-
Chikungunya virus S27 Petersfield	-	Norovirus GI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	Norovirus GII. 4RNA	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-	Zika Virus African strain	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC®25933™	+/-	Zika Virus Asian strain PF13/251013-18	-
<i>Clostridium difficile</i> O:27	-	<i>Proteus mirabilis</i> (CECT 170)	+/-	Zika Virus French Polynesian strain 11468/16	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	Zika Virus French Polynesian strain 11474/16	-
<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CECT 108)	+/-	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-				

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

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* se evaluó frente a DNA extraído de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 10145™) y *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 108) (como modelo), mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit para la detección de *Klebsiella pneumoniae* se evaluó frente a DNA extraído de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC® 10031™), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Serotype capsular 2 (CECT 141), *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 cepa de referencia (ATCC® BAA-2146™) y *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* productora de carbapenemasa (OXA-48) (ATCC® BAA-2524™) (como modelo), mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit para la detección de *Proteus mirabilis* se evaluó frente a DNA extraído de *Proteus mirabilis* (ATCC® 25933™) y *Proteus mirabilis* (CECT 170) (como modelo), mostrando resultados positivos.

ANEXO 1

OPEN Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- PKP101L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- PKP101H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- PKP106L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- PKP106H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- PKP112L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- PKP112H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS- PKP113L
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS- PKP113H
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP101
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP136
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP172

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	Gen <i>oprL</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	Cy5	Gen <i>hns</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ROX	Gen <i>Hemolysin</i>
Control Interno (CI)	HEX, VIC o 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3, A1.4 y A1.5. Según 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).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 RNase/DNase	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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PKP101L, VS-PKP101H, VS- PKP106L, VS-PKP106H, VS-PKP112L y VS-PKP112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 RNase/DNase	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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PKP113L and VS-PKP113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PKP101, VS-PKP136 and VS-PKP172. 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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	Desnaturalización inicial	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 (gen *oprL*), ROX (gen *Hemolysin*), Cy5 (gen *hns*) y HEX, JOE o VIC (control interno). Dependiendo del equipo usado seleccione el canal de detección adecuado (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS- PKP196T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	Gen <i>oprL</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	Cy5	Gen <i>hns</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ROX	Gen <i>Hemolysin</i>
Control Interno (CI)	HEX, VIC o 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PKP196T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 abrir y manipular el tubo *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Reaction-Mix 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *oprL*), ROX (gen *Hemolysin*), Cy5 (gen *hns*) y HEX, JOE o VIC (control interno). Dependiendo del equipo usado seleccione el canal de detección adecuado (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 3

OPEN Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- PKP101LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- PKP101HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- PKP106LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- PKP106HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- PKP112LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- PKP112HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS- PKP113LE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS- PKP113HE
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP101E
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP136E
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- PKP172E

Tabla A3. 1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse 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>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	Gen <i>oprL</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	Cy5	Gen <i>hns</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ROX	Gen <i>Hemolysin</i>
Control de Extracción (CE)	HEX, VIC o JOE *	-

Tabla A3. 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.

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.3, A3.4 y A3.5. Según 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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 de 8 tapones

Tabla A3. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PKP101LE, VS-PKP101HE, VS-PKP106LE, VS-PKP106HE, VS-PKP112LE y VS-PKP112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PKP113LE y VS-PKP113HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 X 4-cap strip

Tabla A3 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PKP101E, VS-PKP136E and VS-PKP172E. 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 RNase/DNase (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 RNase/DNase para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el vial *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNase/DNase (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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A3. 6. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *oprL*), ROX (gen *Hemolysin*), Cy5 (gen *hns*) y HEX, JOE o VIC (control de extracción). Dependiendo del equipo usado seleccione el canal de detección adecuado (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-PKP196TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse 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>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM	Gen <i>oprL</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	Cy5	Gen <i>hns</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ROX	Gen <i>Hemolysin</i>
Control de Extracción (CE)	HEX, VIC o 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.certest.es.

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> & <i>P. mirabilis</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 RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A4. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PKP196TE.

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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 abrir y manipular el tubo *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* Reaction-Mix 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* & *P. mirabilis* 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	Desnaturalización inicial	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 FAM (gen *oprL*), ROX (gen *Hemolysin*), Cy5 (gen *hns*) y HEX, JOE o VIC (control de extracción). Dependiendo del equipo usado seleccione el canal de detección adecuado (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía

1. Anbazhagan D et al. Development of conventional and real-time multiplex pcr assays for the detection of nosocomial pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology* (2011) 42: 448-458 ISSN 1517-8382.
2. Hartman LJ, Selby EB, Whitehouse CA, Coyne SR, Jaissle JG, Twenhafel NA, Burke RL, Kulesh DA. Rapid real-time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rpmA* or *magA* genes associated with the hypermucoviscosity phenotype: screening of nonhuman primates. *J Mol Diagn*. 2009 Sep;11(5):464-71. doi: 10.2353/jmoldx.2009.080136. Epub 2009 Jul 30. PMID: 19644019; PMCID: PMC2729845.
3. Van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Ossewaarde JM. Molecular Diagnosis of Urinary Tract Infections by Semi-Quantitative Detection of Uropathogens in a Routine Clinical Hospital Setting. *PLoS One*. 2016 Mar 8;11(3):e0150755. doi: 10.1371/journal.pone.0150755. PMID: 26954694; PMCID: PMC4783162.
4. <https://www.cdc.gov>
5. Murray P, Rosenthal S, Pfaüer M. *Microbiología médica*. El sevier.
6. Hartman LJ, Selby EB, Whitehouse CA, Coyne SR, Jaissle JG, Twenhafel NA, Burke RL, Kulesh DA. Rapid real-time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rpmA* or *magA* genes associated with the hypermucoviscosity phenotype: screening of nonhuman primates. *J Mol Diagn*. 2009 Sep;11(5):464-71. doi: 10.2353/jmoldx.2009.080136. Epub 2009 Jul 30. PMID: 19644019; PMCID: PMC2729845.
7. Van der Zee, A., Roorda, L., Bosman, G., & Ossewaarde, J. M. (2016). Molecular Diagnosis of Urinary Tract Infections by Semi-Quantitative Detection of Uropathogens in a Routine Clinical Hospital Setting. *PloS one*, 11(3), e0150755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150755>
8. Wilson MG, Pandey S. *Pseudomonas Aeruginosa*. *StatPearls*. Published online August 11, 2021. Accessed May 17, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/>
9. Ashurst J v., Dawson A. *Klebsiella Pneumonia*. *StatPearls*. Published online February 2, 2022. Accessed May 17, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
10. Jamil RT, Foris LA, Snowden J. *Proteus Mirabilis Infections*. *StatPearls*. Published online January 25, 2022. Accessed May 16, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/>

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.

Change Control / Control de Cambios		
Version No. / Versión nº	Changes / Cambios	Fecha / Date
00	Original Version / Versión Original	20/05/2022

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

Revision: 20th May 2022

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead

