

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



M. tuberculosis complex

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 Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTC101L
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTC101H
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTC106L
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTC106H
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTC112L
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTC112H
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTC113L
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTC113H
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC101
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC136
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC172

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 M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTC196T

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 Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 3)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTC101LE
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTC101HE
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTC106LE
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTC106HE
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTC112LE
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTC112HE
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTC113LE
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTC113HE
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC101E
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC136E
VIASURE M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC172E

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 M. tuberculosis complex Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTC196TE

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.....	7
2.	Summary and Explanation	7
3.	Principle of the procedure	8
4.	Reagents provided	8
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	8
6.	Transport and storage conditions.....	9
7.	Precautions for users	9
8.	Test procedure	10
8.1.	Specimen collection, transport and storage	11
8.2.	DNA extraction.....	11
9.	Result interpretation	12
9.1.	References with internal control (references in Annex 1 and 2).....	12
9.2.	References with extraction control (references in Annex 3 and 4).....	13
10.	Limitations of the test	15
11.	Quality control.....	16
12.	Performance characteristics.....	16
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	16
12.2.	Analytical sensitivity	18
12.3.	Analytical specificity.....	18
12.4.	Analytical reactivity	19
	ANNEX 1	20
A1.1	Principle of the procedure.....	20
A1.2	Reagents provided.....	20
A1.3	Test procedure	21
A1.3.1	Lyophilized positive control.....	21
A1.3.2	PCR protocol.....	22
	ANNEX 2	23
A2.1	Principle of the procedure.....	23
A2.2	Reagents provided.....	23
A2.3	Test procedure	23
A2.3.1	Lyophilized positive control.....	23
A2.3.2	Lyophilized reaction mix tube.....	24
A2.3.3	PCR protocol.....	24
	ANNEX 3	25
A3.1	Principle of the procedure.....	25
A3.2	Reagents provided.....	25
A3.3	Test procedure	27
A3.3.1	Lyophilized extraction control	27
A3.3.2	Lyophilized positive control.....	27
A3.3.3	PCR protocol.....	27
	ANNEX 4	29
A4.1	Principle of the procedure.....	29

A4.2 Reagents provided.....	29
A4.3 Test procedure	29
A4.3.1 Lyophilized extraction control	29
A4.3.2 Lyophilized positive control.....	30
A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube.....	30
A4.3.4 PCR protocol.....	30

Contenido

1. Uso previsto	32
2. Introducción y explicación	32
3. Procedimiento	33
4. Reactivos suministrados.....	33
5. Material requerido y no suministrado	33
6. Condiciones de transporte y almacenamiento	34
7. Precauciones para el usuario	34
8. Procedimiento del test	36
8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	36
8.2. Extracción de DNA	37
9. Interpretación de resultados.....	37
9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	37
9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	39
10. Limitaciones del test	40
11. Control de calidad	42
12. Características del test	42
12.1. Sensibilidad y especificidad clínica	42
12.2. Sensibilidad analítica	43
12.3. Especificidad analítica	44
12.4. Reactividad analítica	44
ANEXO 1	45
A1.1 Procedimiento	45
A1.2 Reactivos suministrados	45
A1.3 Procedimiento del test	47
A1.3.1 Control positivo liofilizado	47
A1.3.2 Protocolo PCR	47
ANEXO 2.....	48
A2.1 Procedimiento	48
A2.2 Reactivos suministrados	48
A2.3 Procedimiento del test	48
A2.3.1 Control positivo liofilizado	48
A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada	49
A2.3.3 Protocolo PCR	49
ANEXO 3.....	51
A3.1 Procedimiento	51

A3.2 Reactivos suministrados	51
A3.3 Procedimiento del test	53
A3.3.1 Control de extracción liofilizado	53
A3.3.2 Control positivo liofilizado	53
A3.3.3 Protocolo PCR	53
ANEXO 4	55
A4.1 Procedimiento	55
A4.2 Reactivos suministrados	55
A4.3 Procedimiento del test	56
A4.3.1 Control de extracción liofilizado	56
A4.3.2 Control positivo liofilizado	56
A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada	56
A4.3.4 Protocolo PCR	56
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	59
Trademarks	59

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit is a real-time PCR test designed for the qualitative detection of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) species in respiratory samples (sputum) from individuals suspected of Tuberculosis by their healthcare professional (HCP). This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the infection by species of *Mycobacterium tuberculosis* complex, in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, amplified using real-time PCR, and detected using fluorescent reporter dye probes specific for species of *Mycobacterium tuberculosis* complex.

2. Summary and Explanation

Tuberculosis is a contagious, chronic, and granulomatous disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. This disease was declared in 1993 as a "global health emergency" due to its magnitude as a public health problem. Infection occurs through the inhalation of aerosols that contain the pathogen and are transmitted by people with active pulmonary tuberculosis. After inhalation, the bacteria deposit in the alveoli and spread through the lymphatic circulation. Further dissemination to other parts of the lung and occasionally to other organs is achieved through hematogenous circulation. The most common form of the disease is pulmonary tuberculosis, although tuberculous meningitis, miliary tuberculosis (disseminated), intestinal tuberculosis, lymphadenitis, osteomyelitis and Pott's disease (affected bones) also occur. Primary infection leads to active disease in approximately 10% of infected people, and in 80% of these cases, in the period of two years. In the remaining 90%, the immune system controls the infection, and the individual is not infectious or asymptomatic. It is estimated that one third of the world population has latent tuberculosis; that is, these people are infected with the bacillus, but (still) have not become ill or can transmit the infection. In this clinical state, TB bacilli can remain inactive for years (latent TB). However, when the immune system weakens, the latent infection can be reactivated. In a person infected with HIV, the risk of reactivation of latent TB is more than 10% per year, compared to a lifetime risk of 10-20% for HIV negative people.

Mycobacteria are a group of microorganisms that constitute one of the most serious health problems worldwide. Three groups can be defined within the genus *Mycobacterium*: 1) *Mycobacterium tuberculosis* complex that produces tuberculosis and is formed by the species *M. tuberculosis*, *M. bovis* (including *M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* and *M. suricattae*; 2) *M. leprae* that produces leprosy; 3) Other non-tuberculous mycobacteria (NTM) that are opportunistic and produce non-tuberculous symptoms with less pathogenic power.

When the active form of the disease occurs, the symptoms (cough, fever, night sweats, weight loss, etc.) can be mild for many months. As a result, patients sometimes take time to seek medical attention and transmit the bacteria to others. Over a year, a tubercular patient can infect 10 to 15 people through close contact. If they do not receive the appropriate treatment, up to two thirds of the tubercular patients die.

The application of molecular techniques for diagnosis and typing, more sensitive, specific and quick than traditional tests, allow to improve the knowledge of the epidemiology of the infection and facilitate decisions for its control.

3. Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit is designed for the qualitative detection of DNA from strains of *M. tuberculosis complex* in respiratory samples (sputum). After DNA isolation, the detection of strains of *M. tuberculosis complex* is performed by the amplification of a conserved region of the insertion sequences *IS6110* and *IS1081*, using specific primers and fluorescent-labelled probes.

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

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to verify the correct functioning of the amplification mix.

4. Reagents provided

VIASURE *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* 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 Tubes 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 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1 and 3).

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), 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 PCR System (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q Cycler (Qiagen), Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics), ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L). To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

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

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

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

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from light.
- For Tube format kits: Once the *M. tuberculosis complex* 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 (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-MTC113L, VS-MTC113H, VS-MTC136, VS-MTC172, VS-MTC113LE, VS-MTC113HE, VS-MTC136E and VS-MTC172E). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- 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-MTC101, VS-MTC136, VS-MTC172, VS-MTC101E, VS-MTC136E and VS-MTC172E (compatible 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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits 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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit has been tested on respiratory samples (sputum). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at room temperature for up to 2 hours, or at 4°C for up to 24 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 4°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or ideally at -80°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), 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. Cencenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

For sputum samples, the recommended amount of sputum is approximately 200µL that can be pipetted. * In order to improve the yield and quality of bacterial DNA from sputum specimens, it is recommended a sample pre-treatment with N-acetyl-L-cysteine–sodium hydroxide (NALC-NaOH). Consult DNA Extraction section for more information.

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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit is also available with extraction control (references include in Annexes III and IV), 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 respiratory samples (sputum*), 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:

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

* In order to improve the yield and quality of bacterial DNA from sputum specimens, it is recommended a sample pre-treatment with N-acetyl-L-cysteine–sodium hydroxide (NALC-NaOH). After decontamination, the cell pellets should be resuspended in a maximum final volume of 1 mL of phosphate buffer. In addition, usage of small elution volumes (50-100 µL) may raise the DNA concentration.

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 *Mycobacterium tuberculosis* complex in the positive control well.

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

Controls	<i>M. tuberculosis</i> complex (FAM) ¹	Internal Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls.

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

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

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

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

<i>M. tuberculosis</i> complex (FAM)	Internal Control (HEX)	Interpretation for patient's individual samples	
≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	DNA of <i>M. tuberculosis</i> complex strains Detected
>40 or no signal	≤35 ²	Valid	Targets not Detected ²
>40 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.

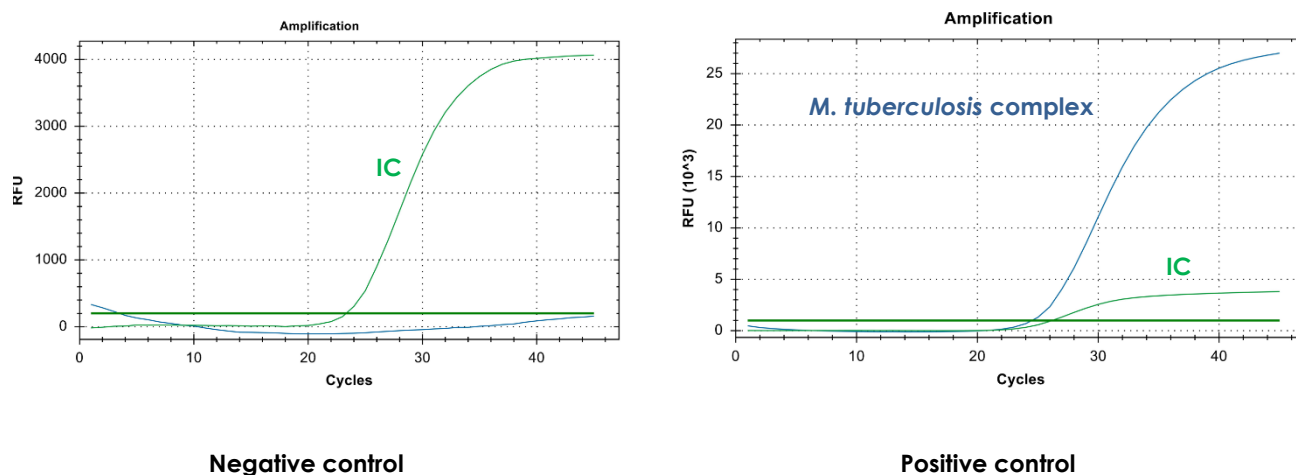
2 In case of *M. tuberculosis* complex target genes negative, IC must show an amplification signal with Ct ≤35. If there is an absence of signal in Ct value >35 of the Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the 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. If the situation is not solved, it is 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 result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Extraction Control (EC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

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 *Mycobacterium tuberculosis* complex in the positive control well. For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	<i>M. tuberculosis</i> complex (FAM) ¹	Extraction Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 3. Expected Performance of Controls

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

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

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 analyse the results:

<i>M. tuberculosis</i> complex (FAM)	Extraction Control (HEX)	Interpretation for patient's individual samples	
≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	DNA of <i>M. tuberculosis</i> complex strains Detected
>40 or no signal	≤35 ²	Valid	Targets not Detected²
>40 or no signal	>35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing²

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.

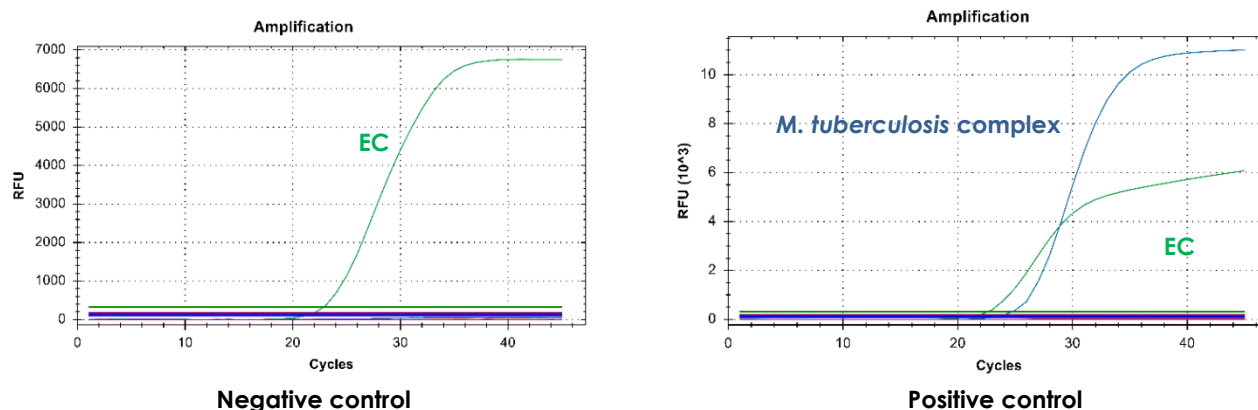
2 In the case of *M. tuberculosis* complex target gene negative, EC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is an absence of signal or Ct value > 35 of the Extraction Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting 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

c) 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).



10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated with DNA extracted from respiratory samples (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 *Mycobacterium tuberculosis* complex, 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 *M. tuberculosis* complex Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in a separate laboratory 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 *Mycobacterium tuberculosis* complex 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 vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent infection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains 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 targeted bacterial sequences (insertion sequences *IS6110* and *IS1081*).
- Negative results do not preclude *Mycobacterium tuberculosis* complex strains 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 *Mycobacterium tuberculosis* complex strains 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 respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that *Mycobacterium tuberculosis* complex strain/s 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 *M. tuberculosis* complex 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 *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit was tested using respiratory samples (sputum) from patients with suspicion of tuberculosis. 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	"Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud" (Hospital Universitario Miguel Servet - HUMS-, Zaragoza, Spain)	DNA extracted from culture (Sputum specimens)	No information is available on the DNA extraction process of the clinical sample panel + StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
	"Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud" (Hospital Universitario Miguel Servet - HUMS-, Zaragoza, Spain)	DNA extracted from culture (Sputum specimens)	No information is available on the DNA extraction process of the clinical sample panel + ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
2	Hospital Ernest Lluch (HEL, Calatayud, Zaragoza, Spain)	bronchoalveolar lavages (BAL), bronchoalveolar aspirates (BAS), sputum	MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
3	Certest Biotec S.L (San Mateo de Gállego, Spain)	bronchoalveolar lavages (BAL), bronchoalveolar aspirates (BAS), sputum	MagDEA® Dx Nucleic Acid Extraction kit using the magLEAD® 12gC (Precision System Science Co) + LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche).	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex

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

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit in sputum samples 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, RFLP-IS6110 and spoligotyping	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	61	4	1	1	0.98 (0.91-1)	0.8 (0.28-0.99)	0.98 (0.9-0.99)	0.8 (0.28-0.99)
	Culture, RFLP-IS6110 and spoligotyping	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	60	5	0	0	1 (0.94-1)	1 (0.47-1)	1 (0.94-1)	1 (0.47-1)
2	Culture and bacilloscopic	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (sputum)	10	35	0	0	1 (0.65-1)	1 (0.87-1)	1 (0.65-1)	1 (0.87-1)
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (BAL)	1	6	0	0	1 (0.054-1)	1 (0.51-1)	1 (0.054-1)	1 (0.51-1)
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (BAS)	2	6	0	0	1 (0.19-1)	1 (0.51-1)	1 (0.19-1)	1 (0.51-1)
3	Amplified <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> Direct Test (Hologic) + smear and culture	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	2	325	0	0	1 (0.15-1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.15-1)	1 (0.98 – 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 *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit.

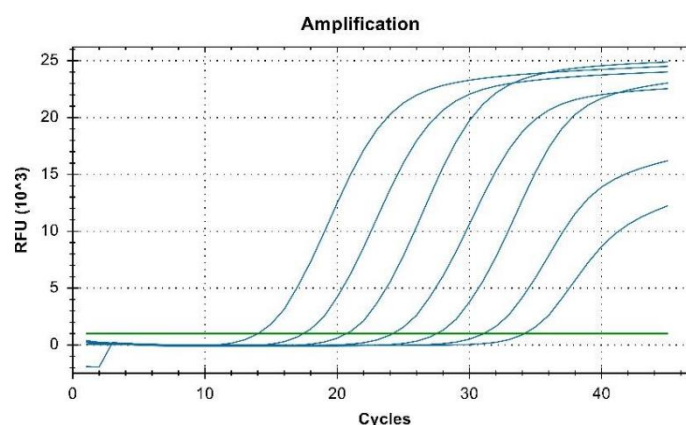
In addition to this, 10 pleural fluid samples, as well as 6 urines and 1 faecal specimen were also analysed with VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit, obtaining concordant results comparing to reference methods used.

Results show high agreement to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex strains using VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of 10 DNA copies per reaction for the insertion sequences IS6110 and IS108, with a positive rate of $\geq 95\%$ (Figure 3).

Figure 3. Dilution series of insertion sequences IS6110 and IS1081 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (FAM channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms associated to respiratory diseases. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175)	-	<i>Mycobacterium gordonae</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium kansasii</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus (clade 3C2a.1)	-	<i>Mycobacterium marinum</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus (H5N8) virus	-	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	Human Adenovirus 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Human Bocavirus	-
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-	Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Human metapneumovirus A and B	-
Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-

Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B	-	<i>Legionella longbeache</i>	-	Human rhinovirus	-
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	MERS Coronavirus	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Mycobacterium abscessus</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-	Respiratory Syncytial virus (RSV) type A and B	-

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit for *M. tuberculosis* complex strains was evaluated using DNA extracted from reference /clinical strains (as templates): *Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *M. tuberculosis* L2 sublineage Beijing, *M. tuberculosis* L4 Euro-American sublineages, *M. tuberculosis* T, *M. tuberculosis* Haarlem, *M. tuberculosis* LAM, *M. tuberculosis* X, *Mycobacterium africanum* (L5 and L6) and *Mycobacterium microti*, showing positive results .

ANNEX 1

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTC101L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTC101H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTC106L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTC106H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTC112L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTC112H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTC113L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTC113H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC101
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC136
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC172

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis complex* 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>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	FAM	Insertion sequences <i>IS6110</i> and <i>IS1081</i>
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A1 2. Target, channel and genes.

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

A1.2 Reagents provided

VIASURE *M. tuberculosis complex* 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>M. tuberculosis</i> complex 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>M. tuberculosis</i> complex 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 *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTC101L, VS-MTC101H, VS-MTC106L, VS-MTC106H, VS-MTC112L and VS-MTC112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex 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>M. tuberculosis</i> complex 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 *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-MTC113L and VS-MTC113H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex 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>M. tuberculosis</i> complex 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 plate during thermal cycling	Transparent	2/9/18 x 4-cap strip

Table A1 5. Reagents and materials provided in VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTC101, VS-MTC136 and VS-MTC172. 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

M. tuberculosis complex 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

M. tuberculosis complex 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 *M. tuberculosis complex* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

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

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

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

Table A1 6. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*M. tuberculosis complex*) 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>M. tuberculosis</i> complex Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTC196T

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis* complex 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>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	FAM	Insertion sequences <i>IS6110</i> and <i>IS1081</i>
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A2. 2. Target, channel and genes.

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

A2.2 Reagents provided

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex 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>M. tuberculosis</i> complex 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 *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTC196T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

M. tuberculosis complex 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 *M. tuberculosis* complex 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 *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *M. tuberculosis complex* 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 tubes in the thermocycler.

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

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

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

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*M. tuberculosis complex*) 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>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTC101LE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTC101HE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTC106LE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTC106HE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTC112LE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTC112HE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTC113LE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTC113HE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC101E
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC136E
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC172E

Table A3. 1. References.

A3.1 Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis complex* 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>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	FAM	Insertion sequences <i>IS6110</i> and <i>IS1081</i>
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 *M. tuberculosis complex* 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>M. tuberculosis</i> complex 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>M. tuberculosis</i> complex 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 *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTC101LE, VS-MTC101HE, VS-MTC106LE, VS-MTC106HE, VS-MTC112LE and VS-MTC112HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex 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>M. tuberculosis</i> complex 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 *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-MTC113LE and VS-MTC113HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, 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>M. tuberculosis</i> complex 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 plate during thermal cycling	Transparent	2/9/18 x 4-cap strip

Table A3 5. Reagents and materials provided in VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTC0101E, VS-MTC136E and VS-MTC172E. 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 to reconstitute the lyophilized *M. tuberculosis complex* Positive Control in an area away from the other components.

A3.3.2 Lyophilized positive control

M. tuberculosis complex 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 *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

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

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

Load the plate or the strips in the thermocycler.

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

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

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

Table A3.6. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*M. tuberculosis* complex) 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>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTC196TE

Table A4. 1. References.

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis complex* 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>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	FAM	Insertion sequences <i>IS6110</i> and <i>IS1081</i>
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.certest.es.

A4.2 Reagents provided

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A4.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis complex</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>M. tuberculosis complex</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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTC196TE.

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 to reconstitute the lyophilized *M. tuberculosis complex* Positive Control in an area away from the other components.

A4.3.2 Lyophilized positive control

M. tuberculosis complex 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 *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis* complex 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 tubes in the thermocycler.

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

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

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

Table A4. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*M. tuberculosis* complex) 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 *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa de DNA procedente de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias (esputo) de individuos con sospecha de Tuberculosis, por su profesional de la salud. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de los especímenes clínicos, se amplifica mediante PCR en tiempo real, y se detecta mediante sondas específicas marcadas con una molécula fluorescente (*quencher*) para especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

2. Introducción y explicación

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa, crónica y granulomatosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enfermedad fue declarada en 1993 como "emergencia sanitaria mundial" por su magnitud como problema de salud pública. La infección se produce por la inhalación de aerosoles que contienen el patógeno y son transmitidos por personas con tuberculosis pulmonar activa. Después de la inhalación, las bacterias se depositan en los alvéolos y se diseminan a través de la circulación linfática. La diseminación adicional a otras partes del pulmón y ocasionalmente a otros órganos se logra a través de la circulación hematológica. La forma más común de la enfermedad es la tuberculosis pulmonar, aunque también se presentan meningitis tuberculosa, tuberculosis miliar (diseminada), tuberculosis intestinal, linfadenitis, osteomielitis y enfermedad de Pott (huesos afectados). La infección primaria conduce a la enfermedad activa en aproximadamente el 10% de las personas infectadas, y en el 80% de estos casos, en el periodo de dos años. En el 90% restante, el sistema inmunológico actúa contra la infección y el individuo no es infeccioso ni asintomático. Se estima que un tercio de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, estas personas están infectadas con el bacilo, pero (aún) no se han enfermado ni pueden transmitir la infección. En este estado clínico, los bacilos de la tuberculosis pueden permanecer inactivos durante años (tuberculosis latente). Sin embargo, cuando el sistema inmunológico se debilita, la infección latente puede reactivarse. En una persona infectada por el VIH, el riesgo de reactivación de la tuberculosis latente es de más de 10% por año, en comparación con un riesgo de por vida del 10-20% para las personas VIH negativas.

Mycobacteria son un grupo de microorganismos que constituyen uno de los problemas de salud más graves del mundo. Se pueden definir tres grupos dentro del género *Mycobacterium*: 1) Complejo de *M. tuberculosis* que produce tuberculosis y está formado por la especie *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida *M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* y *M. suricattae*; 2) *M. leprae* que produce lepra; 3) Otras micobacterias no tuberculosas (MNT) que son oportunistas y producen síntomas no tuberculosos con menos poder patógeno.

Cuando se presenta la forma activa de la enfermedad, los síntomas (tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, etc.) pueden ser leves durante muchos meses. Como resultado, los pacientes a veces se demoran en la búsqueda de atención médica y transmitir la bacteria a otras personas. Durante un año, un paciente tuberculoso puede infectar de 10 a 15 personas a través del contacto cercano. Si no reciben el tratamiento adecuado, hasta dos tercios de los pacientes tuberculosos mueren.

La aplicación de técnicas moleculares de diagnóstico y tipificación, más sensibles, específicas y rápidas que las pruebas tradicionales, permiten mejorar el conocimiento de la epidemiología de la infección y facilitar las decisiones para su control.

3. Procedimiento

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección cualitativa de DNA procedente de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias (esputo). Después del aislamiento del DNA, la detección de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* se realiza mediante la amplificación de una región conservada de las secuencias de inserción *IS6110* e *IS1081*, utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia.

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

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes 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 *M. tuberculosis complex* 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 $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 μL , 20-200 μL).

- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Bloque de carga (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), 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 PCR System (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q Cycler (Qiagen), Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics), ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L). 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 *M. tuberculosis complex* Reaction-Mix ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.

- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- No utilizar reactivos si el desecante no está presente o está roto dentro de los sobres del reactivo.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-MTC113L, VS-MTC113H, VS-MTC136, VS-MTC172, VS-MTC113LE, VS-MTC113HE, VS-MTC136E y VS-MTC172E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- 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 las referencias VS-MTC101, VS-MTC136, VS-MTC172, VS-MTC101E, VS-MTC136E y VS-MTC172E (compatible con los instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®), usar el bloque de carga para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar a colocar las tapas correctamente y evitar la contaminación cruzada.
- 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 M. tuberculosis complex 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 peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) 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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection kit ha sido validado en muestras respiratorias (esputo). Otros tipos de muestras diferentes deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras respiratorias, se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes pueden ser transportados a temperatura ambiente hasta 2 horas, o a 4°C hasta 24 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 24 horas, se recomienda realizar el envío a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse a 4° C hasta 24 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -80°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben ser transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), 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)*.

Para las muestras de esputo, la cantidad recomendada es de aproximadamente 200 µl que se pueden pipetear.

* Para mejorar el rendimiento y la calidad del ADN bacteriano de las muestras de esputo, se recomienda el pretratamiento de las muestras con N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH). Consulte la sección Extracción de DNA para obtener más información.

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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit también está disponible con control de extracción (referencias incluidas en los Anexos III y IV), si el control de extracción (CE) se utiliza para monitorizar el aislamiento del ácido nucleico y como control de inhibición de la PCR, agregue 5µL del CE reconstituido y/o mezcla de tampón de lisis (muestra clínica, así como 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 la reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir de muestras respiratorias (esputo*) 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:

- Invisorb® Spin Universal kit (Invitek).
- MagDEA Dx SV kit, empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).

*Con el fin de mejorar el rendimiento y la calidad del DNA bacteriano extraído a partir de las muestras de esputo, se recomienda un pretratamiento de la muestra con N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH). Después de la descontaminación, los sedimentos celulares se deben resuspender en un volumen final máximo de 1 ml de tampón fosfato. Además, el uso de pequeños volúmenes de elución (50-100 µL) puede aumentar la concentración de DNA.

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 carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el pocillo de control positivo.

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

Controles	Complejo <i>M. tuberculosis</i> (FAM) ¹	Control Interno (HEX) ²	Interpretación de los controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	≤40	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles. Ct valores, no 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:

Complejo <i>M. tuberculosis</i> (FAM)	Control Interno (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de especies del complejo <i>M. tuberculosis</i> Detectado
>40 o sin señal	≤35 ²	Válido	Dianas no Detectadas²
>40 o sin señal	>35 o sin señal ²	No válido	Test Fallido – Repita el Test²

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores, no señal = sin curva de amplificación.

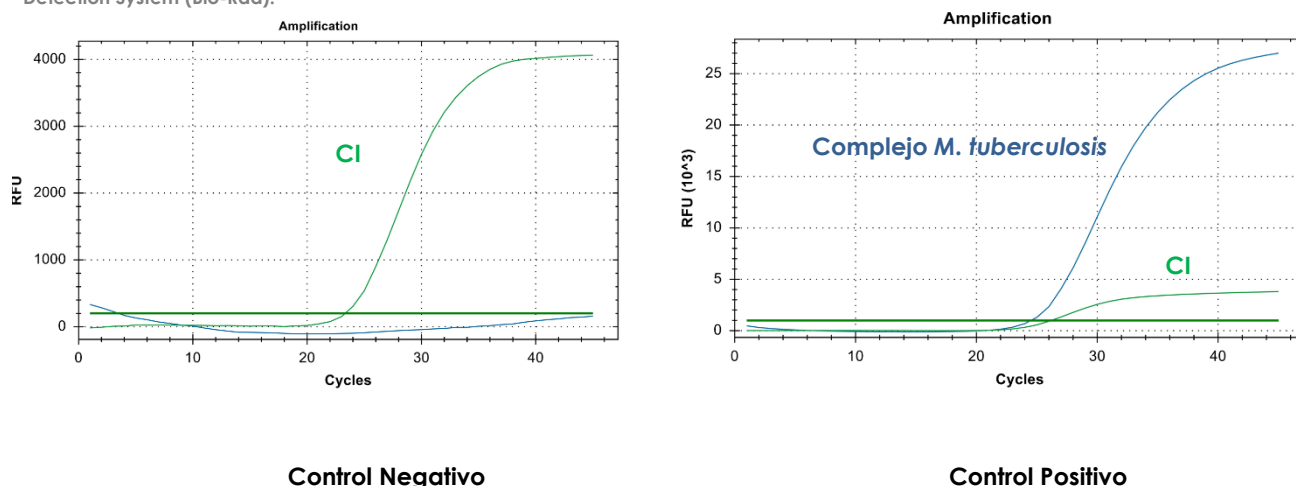
1 El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

2 En el caso de que los genes diana de especies del complejo *M. tuberculosis* resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤35. En el caso de ausencia de señal o un valor de Ct >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 asilado, o
- Volver a extraer y 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 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 carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el pocillo de control positivo. Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Complejo <i>M. tuberculosis</i> (FAM) ¹	Control de Extracción (HEX) ²	Interpretación de los controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	≤40	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Ct valores, no 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 de 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:

Complejo <i>M. tuberculosis</i> (FAM)	Control de Extracción (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de especies del complejo <i>M. tuberculosis</i> Detectado
>40 o sin señal	≤35 ²	Válido	Dianas no Detectadas ²
>40 o sin señal	>35 o sin señal ²	No válido	Test Fallido – Repita el Test ²

Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores. No señal = sin curva de amplificación.

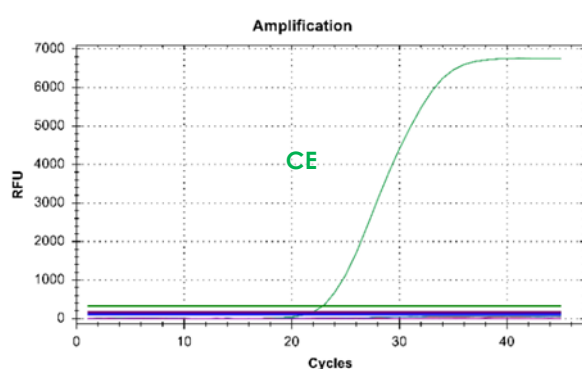
1 El control de extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. Se pueden observar diferencias en los valores de Ct de 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 especies del complejo *M. tuberculosis* resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 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.

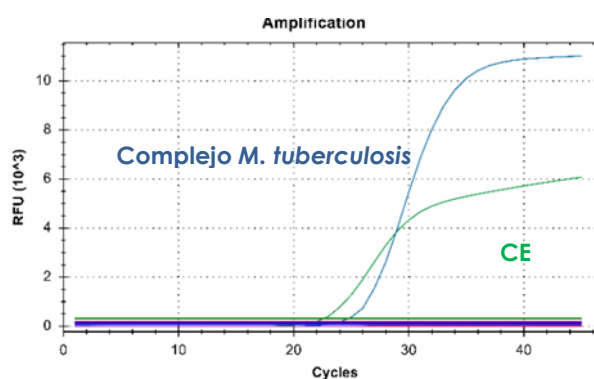
En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.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



Control Negativo



Control Positivo

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras respiratorias (esputo).
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con especies del complejo *M. tuberculosis*, 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 *M. tuberculosis complex* 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 variantes nuevas o desconocidas de especies del complejo *M. tuberculosis*.
 - 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 las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir infecciones por especies del complejo *M. tuberculosis* o durante el tratamiento de la infección.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de bacterias viables y no implica que 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 diana bacterianas (secuencias de inserción *IS6110* e *IS1081*).
- Resultados negativos no excluyen padecer la infección por especies del complejo *M. tuberculosis*, 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 especies del complejo *M. tuberculosis*. 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 el/los patógeno/s.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades respiratorias son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por especies del complejo *M. tuberculosis*, 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 muestras, tratamiento previo de la muestra etc... entre otros.

11. Control de calidad

VIASURE *M. tuberculosis complex* 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 evaluación clínica de VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit se realizó utilizando muestras respiratorias (esputos) procedentes de pacientes con sospecha de tuberculosis. 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. Los resultados fueron los siguientes:

	Lugar	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	"Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud" (Hospital Universitario Miguel Servet -HUMS-, Zaragoza, España)	DNA extraído de cultivo (muestras de esputo)	Información no disponible sobre el proceso de extracción de DNA del panel de muestras clínicas + StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
	"Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud" (Hospital Universitario Miguel Servet -HUMS-, Zaragoza, España)	DNA extraído de cultivo (muestras de esputo)	Información no disponible sobre el proceso de extracción de DNA del panel de muestras clínicas + ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
2	Servicio de Microbiología, Hospital Ernest Lluch (HEL, Zaragoza, Spain)	Lavados broncoalveolares (BAL), aspirados broncoalveolares (BAS), esputo	MagDEA Dx SV kit, empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTlite Real-Time PCR System	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
3	Certest Biotec S.L (San Mateo de Gállego, Spain)	Lavados broncoalveolares (BAL), aspirados broncoalveolares (BAS), esputo	MagDEA® Dx Nucleic Acid Extraction kit empleando el equipo magLEAD® 12gC (Precision System Science Co) + LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche).	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>

Tabla 5. Resumen de los centros, tipos de muestras y flujo de trabajo llevado a cabo durante las evaluaciones clínicas.

Los valores verdadero positivo y negativo, falso positivo y negativo, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit en muestras de esputo, se calcularon en relación con cada ensayo comparador, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Senibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	Cultivo, RFLP-IS6110 y espilogotipado	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	61	4	1	1	0.98 (0.91-1)	0.8 (0.28-0.99)	0.98 (0.9-0.99)	0.8 (0.28-0.99)
	Cultivo, RFLP-IS6110 y espilogotipado	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	60	5	0	0	1 (0.94-1)	1 (0.47-1)	1 (0.94-1)	1 (0.47-1)
2	Cultivo y baciloscopia	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (esputo)	10	35	0	0	1 (0.65-1)	1 (0.87-1)	1 (0.65-1)	1 (0.87-1)
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (BAL)	1	6	0	0	1 (0.054-1)	1 (0.51-1)	1 (0.054-1)	1 (0.51-1)
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (BAS)	2	6	0	0	1 (0.19-1)	1 (0.51-1)	1 (0.19-1)	1 (0.51-1)
3	Amplified <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> Direct Test (Hologic) + frotis y cultivo	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	2	325	0	0	1 (0.15-1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.15-1)	1 (0.98 – 1)

Tabla 6. Valores verdadero positivo y negativo, valores falsos positivo y negativo, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit.

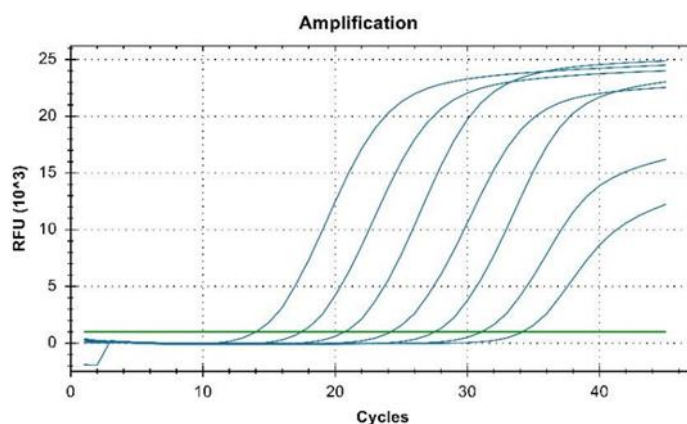
Además, 10 muestras de líquido pleural, así como 6 muestras de orina y una de heces, fueron analizadas con VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit, obteniendo resultados concordantes al método de referencia utilizado.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar especies del complejo *M. tuberculosis* utilizando VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción para las secuencias de inserción IS6110 e IS108, con una tasa de positividad de $\geq 95\%$ (Figura 3).

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de las secuencias de inserción IS6110 e IS108 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos asociados a enfermedades respiratorias. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175)	-	<i>Mycobacterium gordonae</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium kansasii</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus (clade 3C2a.1)	-	<i>Mycobacterium marinum</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus (H5N8) virus	-	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	Human Adenovirus 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Human Bocavirus	-
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-	Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Human metapneumovirus A and B	-
Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B	-	<i>Legionella longbeache</i>	-	Human rhinovirus	-
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	MERS Coronavirus	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Mycobacterium abscessus</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-	Respiratory Syncytial virus (RSV) type A and B	-

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

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit para las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* se evaluó usando DNA extraído de *Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *M. tuberculosis* L2 sublinaje Beijing, *M. tuberculosis* L4 sublinajes Euro-Americanos, *M. tuberculosis* T, *M. tuberculosis* Haarlem, *M. tuberculosis* LAM, *M. tuberculosis* X, *Mycobacterium africanum* (L5 y L6) y *Mycobacterium microti*, mostrando resultados positivos.

ANEXO 1

OPEN Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTC101L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTC101H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTC106L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTC106H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTC112L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTC112H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTC113L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTC113H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC101
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC136
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC172

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

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

Diana	Canal	Gen
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	FAM	Secuencias de inserción <i>IS6110</i> e <i>IS1081</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 *M. tuberculosis complex* 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>M. tuberculosis complex</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>M. tuberculosis complex</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC101L, VS-MTC101H, VS-MTC106L, VS-MTC106H, VS-MTC112L y VS-MTC112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex</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>M. tuberculosis complex</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC113L y VS-MTC113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex</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>M. tuberculosis complex</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative Control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1 5. Reactivos y moléculas proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC101, VS-MTC136 y VS-MTC172. 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 *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* 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 compatibles con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

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

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

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

Tabla A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Complejo *M. tuberculosis*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). (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>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTC196T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE *M. tuberculosis complex* 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, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	FAM	Secuencias de inserción <i>IS6110</i> e <i>IS1081</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.cer-test.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex</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>M. tuberculosis complex</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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC196T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de

RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

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

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

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

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

A2.3.3 Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *M. tuberculosis complex* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

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

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

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

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

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

Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Complejo *M. tuberculosis*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). (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>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTC101LE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTC101HE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTC106LE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTC106HE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTC112LE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTC112HE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTC113LE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTC113HE
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC101E
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC136E
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC172E

Tabla A3. 1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

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

Diana	Canal	Gen
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	FAM	Secuencias de inserción <i>IS6110</i> e <i>IS1081</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 *M. tuberculosis complex* 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>M. tuberculosis complex</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>M. tuberculosis complex</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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC101LE, VS-MTC101HE, VS-MTC106LE, VS-MTC106HE, VS-MTC112LE y VS-MTC112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex</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>M. tuberculosis complex</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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC113LE y VS-MTC113HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores 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>M. tuberculosis complex</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
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC101E, VS-MTC136E y VS-MTC172E. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0,1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de extracción liofilizado

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

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

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

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

A3.3.3 Protocolo PCR

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

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

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

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

Añadir 5 µL de *M. tuberculosis complex* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

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

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

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

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

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

Tabla A3.6. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Complejo *M. tuberculosis*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (CE)). (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>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTC196TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE *M. tuberculosis complex* 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, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	FAM	Secuencias de inserción <i>IS6110</i> e <i>IS1081</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 *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex</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>M. tuberculosis complex</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A4. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC196TE.

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 *M. tuberculosis complex* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

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

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

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

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

A4.3.4 Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *M. tuberculosis complex* 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 *M. tuberculosis complex* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

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

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

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

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

Tabla A4. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Complejo *M. tuberculosis*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (CE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía

1. Selim et al. Duplex real-time PCR assay targeting insertion elements IS1081 and IS6110 for detection of *Mycobacterium bovis* in lymph nodes of cattle. *Biotechnology in Animal Husbandry* 30 (1), p 45-59, 2014.
2. Jesús Gonzalo-Asensio et al. New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its Dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* Complex lineages. *Plos Genetics*, 14(4) April 2018.
3. Ramadass Balamurugan et al. PCR Amplification of the IS6110 Insertion Element of *Mycobacterium tuberculosis* in Fecal Samples from Patients with Intestinal Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006 May; 44(5): 1884-1886.
4. Paul H.M. Savelkoul et al., Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with Real Time PCR: Comparison of different prime-probe sets base on the IS6110 element. *Journal of Microbiological Methods*. Volume 66, Issue 1, July 2006, Pages 177-180
5. L.A.S. Lira et al. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples of patients with pulmonary TB. *Journal of Applied Microbiology* 2012.
6. Francesco Broccolo et al. Rapid Diagnosis of Mycobacterial Infections and Quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* Load by two real-time calibrated PCR assays. *Journal of clinical microbiology*. Oct. 2003, p.4565-4572.
7. Santos FCF et al. Performance of the IS6110-TaqMan assay in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis from different biological samples. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 51 (3):331-337, may-june, 2018.
8. Dilia Fontalvo Rivera y Doris Gómez Camargo. Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Revista Médicas UIS*. 2015;28 (1):39-51.
9. Dorransoro y L. Torroba. Microbiología de la tuberculosis. *An. Sist. Navar.* 2007 Vol 30, Suplemento 2. Fernando Alcaide Fernández de Vega. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Control Calidad SEIMC*.
10. Bergmann JS, Keating WE, Woods GL. Clinical evaluation of the BDProbe Tc ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38:863-865.
11. Gianna M. et al., Evaluation of the BDProbeTc ET System for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary and Extrapulmonary Samples: a Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology*. Apr. 2003, p. 1779-1782.
12. Gülnur Tarhan. Molecular Diagnostic Test Used in the Diagnosis of Tuberculosis. *Cohesive Journal of Microbiology and Infectious Disease*.
13. Emilia Cercenado y Rafael Cantón. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 9ª. Micobacterias.
14. Onno W. Akkerman et al. Comparison of 14 molecular assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bronchoalveolar lavege fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Nov; 51(11):3505-3511.

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

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

Trademarks

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

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

Change Control		
Version nº	Changes	Date
00	Versión Original / Original Version	18/04/2022
01	Actualización de formato. Se mejora la accesibilidad de los IFUs en diferentes idiomas. Se mejora la interpretación de resultados y se actualiza el apartado de las características del test / Format update. The accessibility of IFUs in different languages is improved. The interpretation of results is improved, and performance characteristic point is updated.	11/05/2022

Table A 5. Control change table

Revision: 11th 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



F-566 rev02