

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



*M. tuberculosis complex +
non-tuberculous mycobacteria*

CE IVD



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

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

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTD106L
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTD106H
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTD112L
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTD112H
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTD113L
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTD113H
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD136
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD172
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTD101L
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTD101H
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD101

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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTD196T

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

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

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTD106LE
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTD106HE
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTD112LE
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTD112HE
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTD113LE
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTD113HE
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD136E
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD172E
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTD101LE
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTD101HE
VIASURE M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD101E

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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTD196TE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Content

1.	Intended use.....	8
2.	Summary and Explanation	8
3.	Principle of the procedure	9
4.	Reagents provided	9
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	9
6.	Transport and storage conditions.....	10
7.	Precautions for users	10
8.	Test procedure	12
8.1.	Specimen collection, transport and storage	12
8.2.	DNA extraction	12
9.	Result interpretation	13
9.1.	References with internal control (references in Annex 1 and 2).....	13
9.2.	References with extraction control (references in Annex 3 and 4)	15
10.	Limitations of the test	18
11.	Quality control	19
12.	Performance characteristics.....	19
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	19
12.2.	Analytical sensitivity	21
12.3.	Analytical specificity	22
12.4.	Analytical reactivity	23
	ANNEX 1	24
A1.1	Principle of the procedure.....	24
A1.2	Reagents provided.....	24
A1.3	Test procedure	26
A1.3.1	Lyophilized positive control.....	26
A1.3.2	PCR protocol.....	26
	ANNEX 2	27
A2.1	Principle of the procedure.....	27
A2.2	Reagents provided.....	27
A2.3	Test procedure	28
A2.3.1	Lyophilized positive control.....	28
A2.3.2	Lyophilized reaction mix tube.....	28
A2.3.3	PCR protocol.....	28
	ANNEX 3	30
A3.1	Principle of the procedure.....	30
A3.2	Reagents provided.....	30
A3.3	Test procedure	32
A3.3.1	Lyophilized extraction control	32
A3.3.2	Lyophilized positive control.....	32
A3.3.3	PCR protocol.....	32
	ANNEX 4	34
A4.1	Principle of the procedure.....	34
A4.2	Reagents provided.....	34

A4.3 Test procedure	35
A4.3.1 Lyophilized extraction control	35
A4.3.2 Lyophilized positive control.....	35
A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube.....	35
A4.3.4 PCR protocol.....	35

Contenido

1. Uso previsto	37
2. Introducción y explicación	37
3. Procedimiento	38
4. Reactivos suministrados.....	38
5. Material requerido y no suministrado	38
6. Condiciones de transporte y almacenamiento	39
7. Precauciones para el usuario	40
8. Procedimiento del test	41
8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	41
8.2. Extracción de DNA	42
9. Interpretación de resultados.....	43
9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	43
9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	45
10. Limitaciones del test	48
11. Control de calidad	49
12. Características del test	49
12.1. Sensibilidad y especificidad clínica	49
12.2. Sensibilidad analítica	51
12.3. Especificidad analítica	52
12.4. Reactividad analítica	53
ANEXO 1	55
A1.1 Procedimiento	55
A1.2 Reactivos suministrados	55
A1.3 Procedimiento del test	57
A1.3.1 Control positivo liofilizado	57
A1.3.2 Protocolo PCR	57
ANEXO 2.....	58
A2.1 Procedimiento	58
A2.2 Reactivos suministrados	58
A2.3 Procedimiento del test	59
A2.3.1 Control positivo liofilizado	59
A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada	59
A2.3.3 Protocolo PCR	59
ANEXO 3.....	61
A3.1 Procedimiento	61
A3.2 Reactivos suministrados	61
A3.3 Procedimiento del test	63

A3.3.1 Control de extracción liofilizado	63
A3.3.2 Control positivo liofilizado	63
A3.3.3 Protocolo PCR	64
ANEXO 4.....	65
A4.1 Procedimiento	65
A4.2 Reactivos suministrados	65
A4.3 Procedimiento del test	66
A4.3.1 Control de extracción liofilizado	66
A4.3.2 Control positivo liofilizado	66
A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada	66
A4.3.4 Protocolo PCR	67
Bibliography/Bibliografía	68
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	69
Trademarks.....	69

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit is a real-time PCR test designed for the qualitative detection of DNA from the genus *mycobacterium*, the *M. tuberculosis* complex (MTBC) and the specie *M. tuberculosis* in clinical isolates of mycobacteria and decontaminated sputum (with positive or negative acid-fast bacilli (AFB) smear) from individuals suspected of Tuberculosis infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the genus *mycobacterium*, the *M. tuberculosis* complex (MTBC) and/or the specie *M. tuberculosis* infection, in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, amplified using real time PCR, and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe specific for the genus *mycobacterium*, the *M. tuberculosis* complex (MTBC) and/or the specie *M. tuberculosis*.

2. Summary and Explanation

Tuberculosis (TB) is a contagious, chronic and granulomatous disease caused mainly by the specie *M. tuberculosis*. This disease was declared in 1993 as a "global health emergency" due to its magnitude as a public health problem. Tuberculosis usually affects the lungs, but it can also affect other parts of the body such as the brain, kidneys or spine. Only people who suffer from pulmonary tuberculosis transmit the infection. Primary infection leads to active disease in approximately 10% of infected people, and the 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. The isolation of NTM is increasingly frequent and its differentiation from the *M. tuberculosis* complex is of great clinical and public health importance, since it defines the isolation of patients in special rooms of health centres and the study of patient contacts.

The symptoms of active tuberculosis will depend on where mycobacteria develop within the body. The general symptoms of tuberculosis include fatigue, weight loss, fever and night sweats. Active pulmonary tuberculosis can cause breathing difficulties, chest pain and bloody expectorations. The symptoms of tuberculosis in other parts of the body depend on the area or organ affected. 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 early diagnosis of tuberculosis is essential for the control of the disease in order to interrupt the chain of transmission. 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit is designed for the qualitative detection of DNA from the genus *mycobacterium*, the *M. tuberculosis* complex (MTBC) and/or the specie *M. tuberculosis* in clinical strains and respiratory samples (decontaminated sputum). After DNA isolation, the detection of the genus *mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex and/or *M. tuberculosis* specie is performed by the amplification of a conserved region of the *16S rRNA* gene (genus *mycobacterium*), the insertion sequences IS6110 and IS1081 (*M. tuberculosis* complex), and/or a fragment of the *TbD1* deletion region (*M. tuberculosis* specie), using specific primers and fluorescent-labeled probes.

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

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1 and 3).

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format (Annex 2 and 4).

VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q (Qiagen), Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics) 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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-MTD113L, VS-MTD113H, VS-MTD136, VS-MTD172, VS-MTD113LE, VS-MTD113HE, VS-MTD136E and VS-MTD172E). Remove any excess air 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-MTD101, VS-MTD136, VS-MTD172, VS-MTD101E, VS-MTD136E and VS-MTD172E (compatible for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits 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 + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit has been tested in mycobacterial culture, clinical isolates of mycobacteria and decontaminated sputum (with positive or negative acid-fast bacilli (AFB) smear). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, clinical samples should be collected and labelled appropriately in clean containers and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at Room Temperature (RT) for up to 2 hours, 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), It is recommended shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 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 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

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

Due to VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* 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, 1 µl of the reconstituted EC should be added to the reconstituted Reaction-Mix.

For DNA extraction from mycobacterial culture, clinical isolates of mycobacteria and decontaminated sputum*, you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. We have validated the following extraction kits:

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

* 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 the genus *mycobacterium*, the *M. tuberculosis* complex (MTBC) and the specie *M. tuberculosis* 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	Genus <i>mycobacterium</i> (ROX) ¹	<i>M. tuberculosis</i> (Cy5) ¹	Internal Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls

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.

Note that to consider a positive result, the fluorescence level must be at least 20% of the total fluorescence value.

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

<i>M. tuberculosis</i> complex (FAM)	Genus <i>mycobacterium</i> (ROX)	<i>M. tuberculosis</i> (Cy5)	Internal control (HEX)	Interpretation for patient's individual samples	
≤40	≤40	≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>M. tuberculosis</i> specie Positive (If Ct value FAM < Ct value ROX) ³ or NTM Positive (If Ct value ROX channel < Ct value FAM and Cy5 channels) ³
≤40	>40 or no signal [#]	≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>M. tuberculosis</i> specie Positive (If Ct value FAM > 35) ³ * If Ct value FAM < 35, please repeat the assay: a) obtain a new specimen, re-extract and retest (ideally) or, b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, c) repeat qPCR with the same isolated DNA sample. After retesting one time, if the result holds, the sample should be considered <i>M. tuberculosis</i> specie positive.
≤40	>40 or no signal [#]	>40 or no signal [#]	≤40 or no signal ¹	Valid	MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> Positive (If Ct value FAM > 35) ³ * If Ct value FAM < 35, please repeat the assay: a) obtain a new specimen, re-extract and retest (ideally) or, b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, c) repeat qPCR with the same isolated DNA sample. After retesting one time, if at least one target gene is positive, the sample should be considered MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> positive.
≤40	≤40	>40 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> Positive (If Ct value FAM = Ct value ROX and/or Ct value FAM < Ct value ROX) ³ or NTM Positive (If Ct value FAM > Ct value ROX) ³
>40 or no signal	≤40 [†]	>40 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	NTM positive (In case Cy5 amplifications appear with a Ct > 37, the sample should be considered as NTM Positive).
>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	≤ 35 ²	Valid	Targets not Detected ²
>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	> 35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing²

Table 2. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve. MTBC= *M. tuberculosis* complex, NTM = non-tuberculous mycobacteria.

[#]: Because of the amplified targets, FAM signal is stronger than ROX or ROX and Cy5 signals. It could be observed preferential amplification curve in this channel and absence in ROX or ROX and Cy5 channels. This result also indicates the presence of MTBC strain different from *M. tuberculosis* or *M. tuberculosis* specie.

[†]: Please be aware that amplification curves with later Ct may appear in ROX channel due to environmental NTM.

1 The internal control (IC) shows or not an amplification signal ($C_t \leq 40$ or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 In the case of *genus mycobacterium*, the *M. tuberculosis* complex (MTBC) and the specie *M. tuberculosis* target genes negative, IC must show an amplification signal with $C_t \leq 35$. If there is an absence of signal or C_t 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.

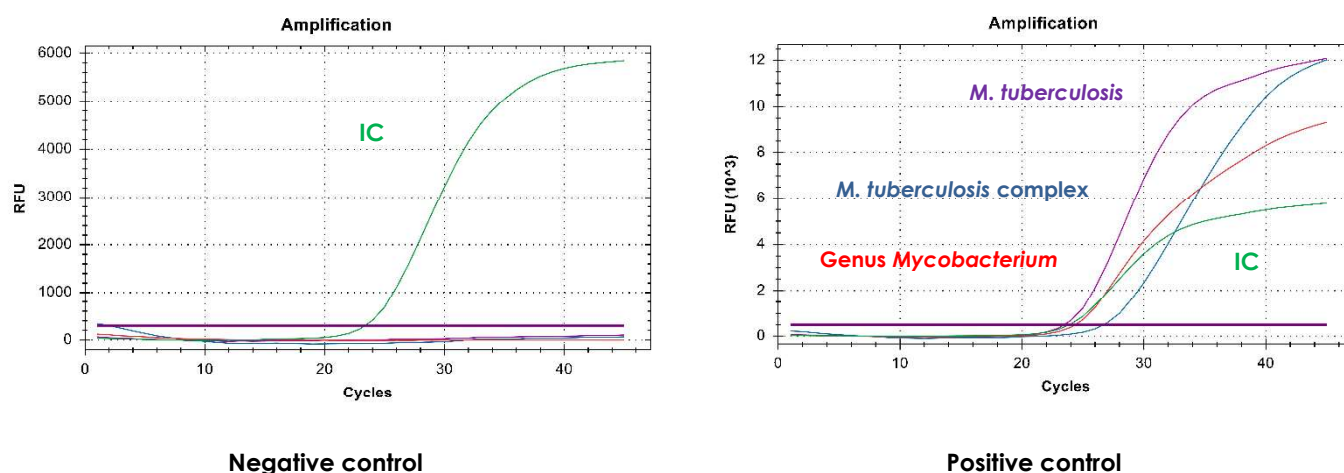
3 Only the integer value of C_t will be considered. If the C_t value given by the PCR equipment has decimals, these will not be considered for the interpretation.

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 the *genus mycobacterium*, the *M. tuberculosis* complex

(MTBC) and the specie *M. tuberculosis* 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	Genus <i>mycobacterium</i> (ROX) ¹	<i>M. tuberculosis</i> (Cy5) ¹	Extraction Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 3. Expected Performance of Controls

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.

Note that to consider a positive result, the fluorescence level must be at least 20% of the total fluorescence value. For interpretation of individual patient sample results, use the following criteria for read and analyze the results:

<i>M. tuberculosis</i> complex (FAM)	Genus <i>mycobacterium</i> (ROX)	<i>M. tuberculosis</i> (Cy5)	Extraction Control (HEX)	Interpretation for patient's individual samples	
≤40	≤40	≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>M. tuberculosis</i> specie Positive (If Ct value FAM < Ct value ROX) ³ or NTM Positive (If Ct value ROX channel < Ct value FAM and Cy5 channels) ³
≤40	>40 or no signal [#]	≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>M. tuberculosis</i> specie Positive (If Ct value FAM > 35) ³ * If Ct value FAM < 35, please repeat the assay: a) obtain a new specimen, re-extract and retest (ideally) or, b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, c) repeat qPCR with the same isolated DNA sample. After retesting one time, if at least one target gene is positive, the sample should be considered <i>M. tuberculosis</i> specie positive.
≤40	>40 or no signal [#]	>40 or no signal [#]	≤40 or no signal ¹	Valid	MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> Positive (If Ct value FAM > 35) ³ * If Ct value FAM < 35, please repeat the assay: a) obtain a new specimen, re-extract and retest (ideally) or, b) re-extract and retest another

					aliquot of the same specimen or, c) repeat qPCR with the same isolated DNA sample. After retesting one time, if at least one target gene is positive, the sample should be considered <i>MTBC</i> strains different from <i>M. tuberculosis</i> positive.
≤40	≤40	>40 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> Positive (If Ct value FAM = Ct value ROX and/or Ct value FAM < Ct value ROX)) ³ or NTM Positive (If Ct value FAM > Ct value ROX) ³
>40 or no signal	≤40 [†]	>40 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	NTM positive (In case Cy5 amplifications appear with a Ct > 37, the sample should be considered as NTM Positive).
>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	≤ 35 ²	Valid	Targets not Detected ²
>40 or no signal	>40 or no signal	>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. MTBC= *M. tuberculosis* complex, NTM = non-tuberculous mycobacteria.

#: Because of the amplified targets, FAM signal is stronger than ROX or ROX and Cy5 signals. It could be observed preferential amplification curve in this channel and absence in ROX or ROX and Cy5 channels. This result also indicates the presence of MTBC strain different from *M. tuberculosis* or *M. tuberculosis* specie.

†: Please be aware that amplification curves with later Ct may appear in ROX channel due to environmental NTM.

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 *genus mycobacterium*, the *M. tuberculosis* complex (MTBC) and the specie *M. tuberculosis* 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 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.

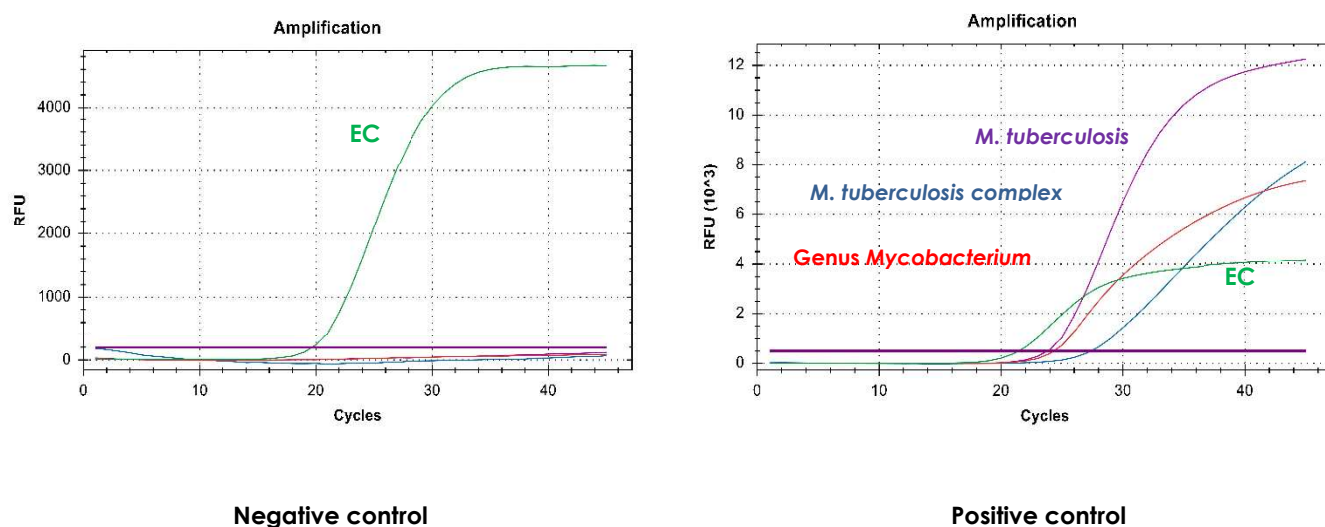
3 Only the integer value of Ct will be considered. If the Ct value given by the PCR equipment has decimals, these will not be considered for the interpretation.

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:

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

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



10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with DNA extracted from mycobacterial culture, clinical isolates of mycobacteria and decontaminated sputum (with positive or negative acid-fast bacilli (AFB) smear).
- 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 genus *mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex (MTBC) and/or the specie *M. tuberculosis*, 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 + non-tuberculous mycobacteria Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in separate laboratory areas.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the bacterial DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown species of the genus *mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex (MTBC) and/or *M. tuberculosis*.
 - 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 impact of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection by the genus *mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex (MTBC) and/or *M. tuberculosis* or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable bacteria and does not imply that these bacteria are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets sequences (16S rRNA gene, the insertion sequences IS6110 and IS1081, and/or a fragment of the *TbD1* deletion region).
- Negative results do not preclude genus *mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex (MTBC) and/or *M. tuberculosis* 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 genus *mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex (MTBC) and/or *M. tuberculosis* 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 genus *mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex (MTBC) and/or *M. tuberculosis* 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit was tested using clinical strains and the remnant of respiratory specimens (decontaminated sputum) from patients with symptoms of respiratory infection. In order to determine the clinical diagnostic accuracy, an evaluation has been conducted through collaboration with a national entity. A summary of the site, sample type and workflow is included in the following table.

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Barcelona, Spain	clinical strains	Seegene DNA extraction protocol + CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).	<i>Mycobacterium</i> spp. (NTM)
				<i>M. tuberculosis</i> complex (MTBC)
				<i>M. tuberculosis</i> (MTB)
	Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Barcelona, Spain	sputums	Seegene DNA extraction protocol + CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).	<i>Mycobacterium</i> spp. (NTM)
				<i>M. tuberculosis</i> complex (MTBC)
				<i>M. tuberculosis</i> (MTB)
2	Certest Biotec S.L (San Mateo de Gállego, Spain)	bronchoalveolar lavages (BAL)	MagDEA® Dx Nucleic Acid Extraction kit using the magLEAD® 12gC (Precision System Science Co) + LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche).	<i>M. tuberculosis</i> complex (MTBC)
		bronchoalveolar aspirates (BAS)		<i>Mycobacterium</i> spp. (NTM)
		sputum		<i>M. tuberculosis</i> (MTB)

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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following tables:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	Culture	NTM	14	38	0	0	1 (0.76-1)	1 (0.9-1)	1 (0.76-1)	1(0.9-1)
		MTBC	15	37	0	0	1(0.78-1)	1(0.9-1)	1(0.78-1)	1(0.9-1)
		MTB	24	27	0	1	0.96 (0.79-0.99)	1 (0.87-1)	1 (0.87-1)	0.96 (0.79-0.99)
	Reference method*	NTM	22	91	9	8	0.73 (0.54-0.87)	0.91(0.83-0.95)	0.7(0.51-0.85)	0.91(0.84-0.96)
		MTBC	52	77	0	1	0.98(0.89-1)	1(0.95-1)	1(0.91-1)	0.98 (0.92-0.99)
		MTB	47	78	1	4	0.92(0.81-0.97)	0.98 (0.93-1)	0.97 (0.87-0.99)	0.95(0.87-0.98)
2	Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (Hologic) + smear and culture	MTBC	2	325	0	0	1 (0.15-1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.34-1)	1 (0.99 – 1)
		NTM	5	322	0	0	1 (0.47 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.65 – 1)	(0.99 – 1)
		MTB	0	327	0	0	NA	1 (0.98 – 1)	NA	1 (0.99 – 1)

Table 6. True positive (TP) and negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV), Predictive Negative Values (NPV) for VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit. MTBC = *M. tuberculosis* complex, MTB = *M. tuberculosis*, NTM = non-tuberculosis mycobacteria.

* Characterization performed with culture, and in addition, in patients with respiratory NTM infection, NTM species were identified with INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Fujirebio), and patients with TB diagnosis, MTBC identification was performed with the SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid Test (Abbott).

Results show high agreement to detect targets using VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of 10 DNA copies per reaction for the insertion sequences IS6110 and IS1081, the 16S rRNA gene and the *TbD1* deletion region, with a positive rate of $\geq 95\%$.

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

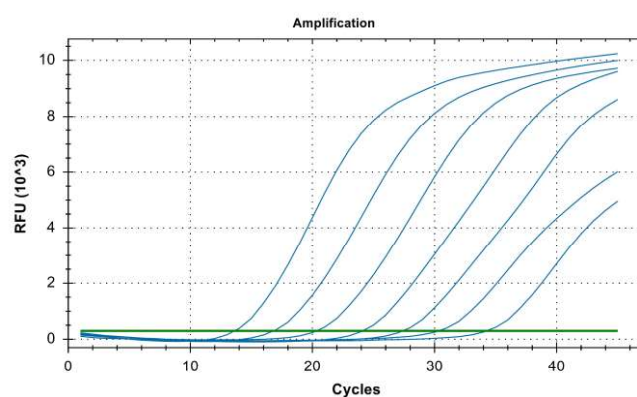


Figure 4. Dilution series of 16S rRNA gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel ROX).

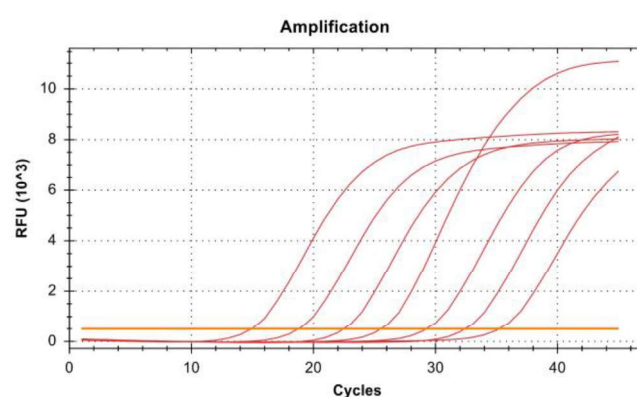
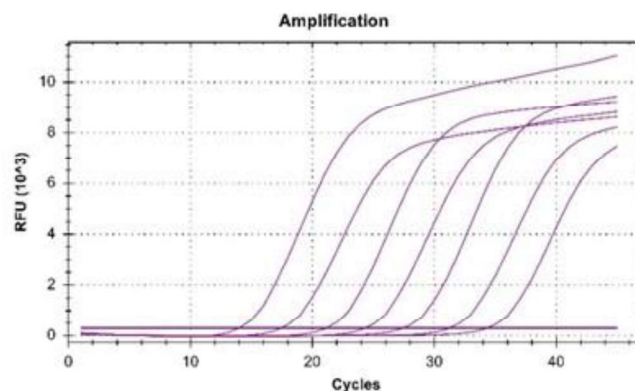


Figure 5. Dilution series of *TbD1* deletion region (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel Cy5)



12.3. Analytical specificity

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

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit for the specie *M. tuberculosis* was evaluated using DNA extracted from reference strains (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331 and *Mycobacterium tuberculosis* X004439) and from clinical strains containing *M. tuberculosis* lineages 1, 2, 3, and lineage 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage) as templates, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit for the *Mycobacterium* genus was evaluated using DNA extracted from reference strains (*Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium xenopi*), from clinical strains (*Mycobacterium tuberculosis* lineage 1, 2, 3, and 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage), *Mycobacterium africanum* lineage 5 and 6, *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Mycobacterium chelonae* complex (group III-*M. abscessus*), *Mycobacterium intracellulare*) and from clinical samples (*Mycobacterium celatum*,, *Mycobacterium chimaera-intracellulare* as templates, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit for *M. tuberculosis* complex strains was evaluated using DNA extracted from reference strains (*Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum* and *Mycobacterium microti*, as well as from clinical strains (*Mycobacterium tuberculosis* lineage 1, 2, 3, and 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage), and *Mycobacterium africanum* lineage 5 and 6) as templates, showing positive results.

ANNEX 1

OPEN FORMAT AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTD106L
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTD106H
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTD112L
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTD112H
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTD113L
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTD113H
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD136
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD172
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTD101L
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTD101H
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD101

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria 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>M. tuberculosis</i> complex	FAM	Insertion sequences IS6110 and IS1081
<i>Mycobacterium</i> spp.	ROX	16S rRNA gene
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cy5	TbD1 deletion region
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.cerfetest.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTD101L, VS-MTD101H, VS-MTD106L, VS-MTD106H, VS-MTD112L and VS-MTD112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-MTD113L and VS-MTD113H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/9/18 X 4-cap strip

Table A1 5. Reagents and materials provided in VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTD101, VS-MTD136 and VS-MTD172. 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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*), ROX (*Mycobacterium spp.*), Cy5 (*M. tuberculosis*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). (Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check the 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTD196T

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria 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>M. tuberculosis</i> complex	FAM	Insertion sequences IS6110 and IS1081
<i>Mycobacterium</i> spp.	ROX	16S rRNA gene
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cy5	<i>TbD1</i> deletion region
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.cerest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTD196T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps.

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

Load the plate, the strips, or 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), ROX (*Mycobacterium* spp.), Cy5 (*M. tuberculosis*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check the most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 3

OPEN FORMAT AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTD106LE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTD106HE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTD112LE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTD112HE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTD113LE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTD113HE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD136E
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD172E
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTD101LE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTD101HE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD101E

Table A3. 1. References.

A3.1 Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria 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>M. tuberculosis</i> complex	FAM	Insertion sequences IS6110 and IS1081
<i>Mycobacterium</i> spp.	ROX	16S rRNA gene
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cy5	<i>TbD1</i> deletion region
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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTD101LE, VS-MTD101HE, VS-MTD106LE, VS-MTD106HE, VS-MTD112LE and VS-MTD112HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-MTD113LE and VS-MTD113HE.

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

Table A3. 5. Reagents and materials provided in VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTD101E, VS-MTD136E and VS-MTD172E. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A3.3 Test procedure

A3.3.1 Lyophilized extraction control

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

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

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

A3.3.2 Lyophilized positive control

M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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 + *non-tuberculous mycobacteria* 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), ROX (*Mycobacterium* spp.), Cy5 (*M. tuberculosis*) and HEX, JOE or VIC channels (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check the 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</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTD196TE

Table A4. 1. References.

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria 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>M. tuberculosis</i> complex	FAM	Insertion sequences IS6110 and IS1081
<i>Mycobacterium</i> spp	ROX	16S rRNA gene
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cy5	<i>TbD1</i> deletion region
Extraction Control (EC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A4. 2. Target, channel and genes.

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

A4.2 Reagents provided

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

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria 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</i> complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTD196TE.

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* + *non-tuberculous mycobacteria* Positive Control in an area away from the other components.

A4.3.2 Lyophilized positive control

M. tuberculosis complex + *non-tuberculous mycobacteria* 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* + *non-tuberculous mycobacteria* 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* + *non-tuberculous mycobacteria* 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 + *non-tuberculous mycobacteria* 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 + *non-tuberculous mycobacteria* 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), ROX (*Mycobacterium spp.*), Cy5 (*M. tuberculosis*) and HEX, JOE or VIC channels (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check the most common detection channels consult website www.certest.es).

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa de DNA del género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o de la especie *M. tuberculosis* en cultivo de micobacterias, aislados clínicos de micobacterias y esputo descontaminado (con baciloscopia positiva o negativa), procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección tuberculosa, por su profesional de la salud. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por el género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o de la especie *M. tuberculosis*, en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído de muestras clínicas, y posteriormente amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar las especies el género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o de la especie *M. tuberculosis*.

2. Introducción y explicación

La tuberculosis (TB) es una enfermedad contagiosa, crónica y granulomatosa causada por *M. tuberculosis*. Esta enfermedad fue declarada en 1993 como una "emergencia sanitaria mundial" debido a su magnitud como problema de salud pública. La infección ocurre a través de 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 alveolos y se diseminan por la circulación linfática. La diseminación adicional a otras partes del pulmón y ocasionalmente a otros órganos se logra mediante la circulación hematógena. 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 período de dos años. En el 90% restante, el sistema inmune controla la infección y el individuo no es infeccioso ni asintomático. Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, esas personas están infectadas por el bacilo, pero (aún) no han enfermado ni pueden transmitir la infección. En este estado clínico, los bacilos de TB pueden permanecer inactivos durante años (TB latente). Sin embargo, cuando el sistema inmunitario se debilita, la infección latente puede reactivarse. En una persona infectada por el VIH, el riesgo de reactivación de la TB latente es más de 10% por año, en comparación con un riesgo de por vida de 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. El aislamiento de las MNT es cada vez más frecuente y su diferenciación del complejo de *M. tuberculosis* es de gran importancia clínica y de salud pública, ya que define el aislamiento de los pacientes en salas especiales de los centros de salud y el estudio de los contactos de los pacientes.

Los síntomas de la tuberculosis activa dependerán de dónde se desarrollen las micobacterias dentro del cuerpo. Los síntomas generales de la tuberculosis incluyen fatiga, pérdida de peso, fiebre y sudores nocturnos. La tuberculosis pulmonar activa puede causar dificultades respiratorias, dolor en el pecho y expectoraciones con sangre. Los síntomas de la tuberculosis en otras partes del cuerpo dependen del área u órgano afectado. 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.

El diagnóstico precoz de la tuberculosis es esencial para el control de la enfermedad con el fin de interrumpir la cadena de transmisión. La aplicación de técnicas moleculares para el 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 + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección cualitativa de DNA del género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o de la especie *M. tuberculosis*, en cepas clínicas y muestras respiratorias (esputos descontaminados). Después del aislamiento del DNA, la detección del género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* y/o de la especie *M. tuberculosis* se realiza mediante la amplificación de una región conservada de gen *16S rRNA* (género *mycobacterium*), de las secuencias de los insertos IS6110 e IS1081 (complejo *M. tuberculosis*), y/o de la región de delección de *TbD1* (especie *M. tuberculosis*), utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia.

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

4. Reactivos suministrados

VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para "open 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 y rotor-gene format" con control de extracción y el Anexo 4 para formato de tubo 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 + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor Gene (Anexos 1 y 3).
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).

VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q (Qiagen), Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics) 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 + non-tuberculous mycobacteria* Reaction-Mix ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de

tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-MTD113L, VS-MTD113H, VS-MTD136, VS-MTD172, VS-MTD113LE, VS-MTD113HE, VS-MTD136E y VS-MTD172E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para VS-MTD101, VS-MTD136, VS-MTD172, VS-MTD101E, VS-MTD136E y VS-MTD172E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test Viasure M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria 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 y rotor-gene format" con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con control interno, el Anexo 3 para "open y rotor-gene format" con productos con control de extracción y el Anexo 4 para formato de tubo con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit ha sido testado en cepas clínicas/ de referencia de micobacterias, así como en esputos descontaminados. Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras respiratorias deben recogerse y etiquetarse 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 -20°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 respiratorias deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), 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. Cencenado 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.

VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit también está disponible con control de extracción (las referencias se incluyen en los Anexos III y IV). Si el control de extracción (EC) se utiliza para monitorizar la extracción de ácidos nucleicos y como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 5µl del Control de Extracción reconstituido a la muestra y / o mezcla de tampón de lisis (muestra clínica, así como al control positivo y / o control negativo). Cierre cada tubo y mezcle con la ayuda de un vórtex durante 10 segundos. Si el control de extracción se usa solo como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 1 µl del Control de Extracción a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir de cultivo de micobacterias, aislados clínicos de micobacterias y esputos*, puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático o cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

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

*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 el género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y de la especie *M. tuberculosis* en el pocillo de control positivo.

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

Controles	Secuencias IS6110 e IS1081 (FAM) ¹	16S rRNA (ROX) ¹	Región de delección de <i>TbD1</i> (Cy5) ¹	Control Interno (HEX) ²	Interpretación de los controles
Control Positivo (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (NC)	>40 o no señal	>40 o no señal	>40 o no señal	≤40	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles.

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

² El Control Interno (IC) debería mostrar una señal de amplificación ($C_t \leq 40$) 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.

Tener en cuenta que para poder considerar un resultado como positivo, el nivel de fluorescencia debe ser al menos el 20 % del valor de fluorescencia total.

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

Secuencias IS6110 e IS1081 (FAM)	16S rRNA (ROX)	Region de delección de TbD1 (Cy5)	Control Interno (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	≤40	≤40	≤40 or no signal ¹	Válido	Especie <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si el valor de Ct en FAM < valor Ct en ROX) ³ ○ NTM Positiva (Si el valor de Ct en ROX < valor Ct en FAM y Cy5) ³
≤40	>40 or no signal [#]	≤40	≤40 or no signal ¹	Válido	Especie <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si el valor de Ct en FAM > 35) ³ * Si el valor de Ct FAM < 35, repita el test dependiendo del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y volver a testar (idealmente), b) volver a extraer otra alícuota de la misma muestra y volver a probar o, c) repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada. Después de repetir la prueba una vez, si el resultado se mantiene, la muestra debe considerarse como Especie <i>M. tuberculosis</i> Positiva.
≤40	>40 or no signal [#]	>40 or no signal #	≤40 or no signal ¹	Válido	Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si el valor de Ct en FAM > 35) ³ * Si el valor de Ct FAM < 35, repita el test dependiendo del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y volver a testar (idealmente), b) volver a extraer otra alícuota de la misma muestra y volver a probar o, c) repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada. Después de repetir la prueba una vez, si el resultado se mantiene, la muestra debe considerarse como Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva.
≤40	≤40	>40 or no signal	≤40 or no signal ¹	Válido	Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si el valor de Ct en FAM = valor Ct en ROX y/o Valor de Ct en FAM < valor Ct en ROX) ³ ○ NTM Positivas (Si el valor de Ct en FAM > valor de Ct en ROX) ³
>40 or no signal	≤40 [†]	>40 or no signal	≤40 or no signal ¹	Válido	NTM Positiva (En caso de que aparezcan amplificaciones de Cy5 con un Ct > 37, la muestra debe ser considerada como NTM Positiva).
>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	≤ 35 ²	Válido	Dianas no detectadas ²
>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	> 35 or no signal ²	Inválido	Test fallido- Repita Test ²

Tabla 2. Interpretación de los resultados de las muestras de pacientes individuales. Valores Ct. sin señal = sin curva de amplificación. MTBC= *M. tuberculosis* complex (complejo *M. tuberculosis*), NTM = non-tuberculous micobacteria (micobacterias no tuberculosas).

#: Debido a las dianas amplificadas, la señal FAM es más intensa que las señales ROX ó ROX y Cy5. Se puede observar curva de amplificación preferencial en este canal y ausencia en los canales ROX ó ROX y Cy5. Este resultado también indica la presencia de una cepa MTBC diferente de la especie *M. tuberculosis* o *M. tuberculosis*.

†: Tenga en cuenta que las curvas de amplificación con Ct tardío pueden aparecer en el canal ROX debido a NTM ambiental.

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 del género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y de la especie *M. tuberculosis* resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control interno, el resultado se considera "invalido" 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.

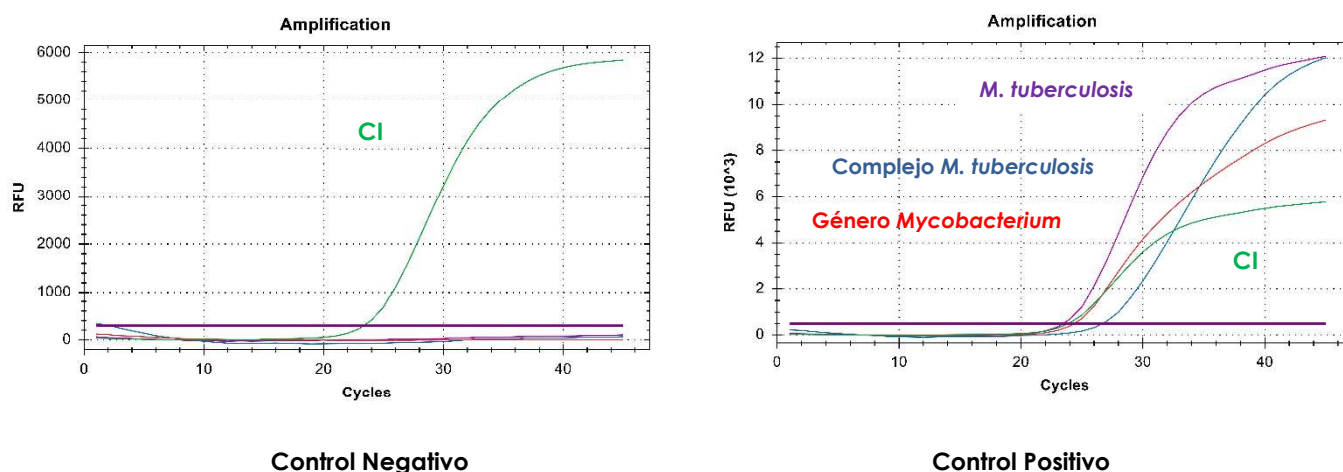
CCC

En caso de un resultado ambiguo continuado, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, para verificar el correcto desempeño de cada paso de qPCR y revisar los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado.

Según el material disponible:

- a) repetir la PCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- b) volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- c) obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

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



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

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

Se recomienda establecer los valores de umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación (antes de realizar la interpretación de los resultados de la muestra del paciente), con el objetivo de asegurar 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 equipos 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 el género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y de la especie *M. tuberculosis* en el pocillo de control positivo. Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Secuencias IS6110 e IS1081 (FAM) ¹	16S rRNA (ROX) ¹	Región de delección de <i>TbD1</i> (Cy5) ¹	Control de Extracción (HEX) ²	Interpretación de los controles
Control Positivo (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (NC)	>40 o no señal	>40 o no señal	>40 o no señal	≤40	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles.

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

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

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.

Tener en cuenta que para poder considerar un resultado como positivo, el nivel de fluorescencia debe ser al menos el 20 % del valor de fluorescencia total.

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

Secuencias IS6110 e IS1081 (FAM)	16S rRNA (ROX)	Región de delección <i>TbD1</i> (Cy5)	Control de Extracción (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	≤40 *	≤40	≤40 o no señal ¹	Válido	Especie <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si el valor de Ct en FAM < valor Ct en ROX) ³ o NTM Positiva (Si el valor de Ct en ROX < valor Ct en FAM y Cy5) ³
≤40	>40 o no señal #	≤40	≤40 o no señal ¹	Válido	Especie <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si el valor de Ct en FAM > 35) ³ * Si el valor de Ct FAM < 35, repita el test dependiendo del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y volver a testar (idealmente), b) volver a extraer otra alícuota de la misma muestra y volver a probar o, c) repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada. Después de repetir la prueba una vez, si el resultado se mantiene, la muestra debe considerarse como Especie <i>M.</i>

					tuberculosis Positiva.
≤40	>40 o no señal #	>40 o no señal #	≤40 o no señal ¹	Válido	Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si el valor de Ct en FAM > 35) ³ * Si el valor de Ct FAM < 35, repita el test dependiendo del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y volver a testar (idealmente), b) volver a extraer otra alícuota de la misma muestra y volver a probar o, c) repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada. Después de repetir la prueba una vez, si el resultado se mantiene, la muestra debe considerarse como Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva.
≤40	≤40 *	>40 o no señal	≤40 o no señal ¹	Válido	Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si el valor de Ct en FAM = valor Ct en ROX y/o Valor de Ct en FAM < valor Ct en ROX) ³ o NTM Positivas (Si el valor de Ct en FAM > valor de Ct en ROX) ³
>40 o no señal	≤40 †	>40 o no señal	≤40 o no señal ¹	Válido	NTM Positiva
>40 o no señal	>40 o no señal	>40 o no señal	≤ 35 ²	Válido	Dianas no detectadas ²
>40 o no señal	>40 o no señal	>40 o no señal	> 35 o no señal ²	Inválido	Test fallido- Repita Test ²

Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras. Valores Ct. sin señal = sin curva de amplificación. MTBC= *M. tuberculosis* complex (complejo *M. tuberculosis*), NTM = non-tuberculous micobacteria (micobacterias no tuberculosas).

#: Debido a las dianas amplificadas, la señal FAM es más intensa que las señales ROX ó ROX y Cy5. Se puede observar curva de amplificación preferencial en este canal y ausencia en los canales ROX ó ROX y Cy5. Este resultado también indica la presencia de una cepa MTBC diferente de la especie *M. tuberculosis* o *M. tuberculosis*.

†: Tenga en cuenta que las curvas de amplificación con Ct tardío pueden aparecer en el canal ROX debido a NTM ambiental.

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

2 En el caso de que los genes diana del género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y de la especie *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 "inválido" 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.

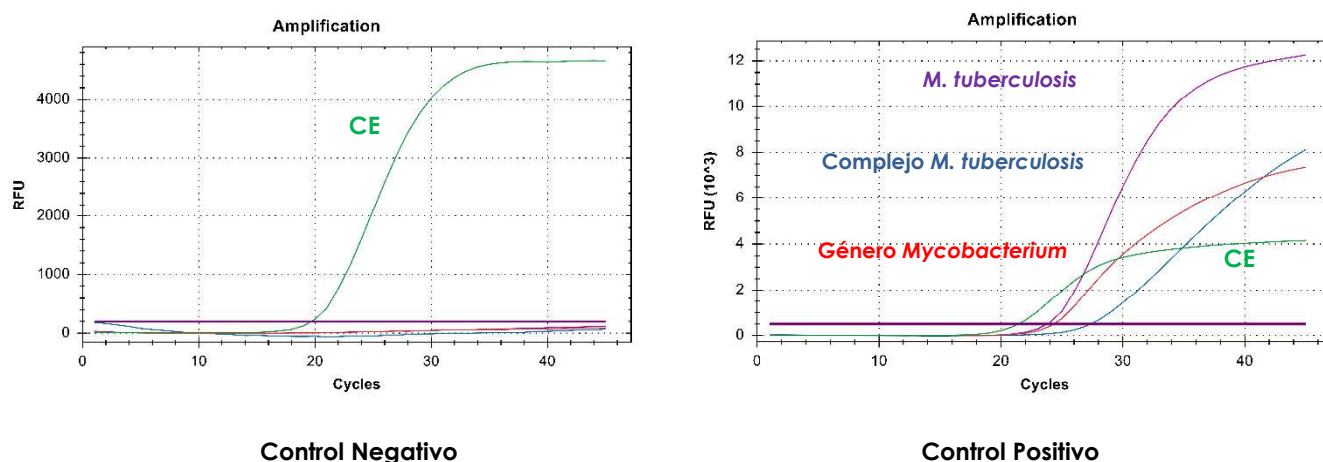
3 Únicamente se considerará el valor entero de Ct. Si el valor de Ct dado por el equipo PCR tiene decimales, estos no serán considerados para la interpretación.

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. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado.

Según el material disponible:

- repetir la PCR 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.

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



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de cultivo de micobacterias, aislados clínicos de micobacterias y esputo descontaminado (con baciloscopia positiva o negativa).
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con el género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o la especie *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 + non-tuberculous mycobacteria Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.

- Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA bacteriano durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas del género *mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o de la especie *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 el género *mycobacterium*, el complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o la especie *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 bacterianas diana (gen *16S rRNA*, las secuencias de inserción *IS6110* e *IS1081*, y/o la región de delección *TbD1*).
 - Resultados negativos no excluyen padecer infección por el género *mycobacterium*, el complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o la especie *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 el género *mycobacterium*, el complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o la especie *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 los patógenos.
 - 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 el género *mycobacterium*, el complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o la especie *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 muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.

11. Control de calidad

VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) o el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Las evaluaciones clínicas de VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit se realizaron usando cepas clínicas y remanentes de muestras de esputo descontaminadas de pacientes con síntomas de infección respiratoria. Con el fin de determinar la precisión del diagnóstico clínico, se

ha realizado una evaluación clínica en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de la localización, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado:

	Lugar	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Dianas
1	Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Barcelona, España.	Cepas clínicas	Protocolo de extracción de DNA de Seegene + CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).	<i>Mycobacterium</i> spp. (NTM)
				Complejo <i>M. tuberculosis</i> (MTBC)
				<i>M. tuberculosis</i> (MTB)
	Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Barcelona, España.	Espustos	Protocolo de extracción de DNA de Seegene + CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).	<i>Mycobacterium</i> spp. (NTM)
				Complejo <i>M. tuberculosis</i> (MTBC)
				<i>M. tuberculosis</i> (MTB)
2	Certest Biotec S.L (San Mateo de Gállego, Spain)	Lavados bronqueolaveolares (BAL)	MagDEA® Dx Nucleic Acid Extraction kit using the magLEAD® 12gC (Precision System Science Co) + LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche).	Complejo <i>M. tuberculosis</i> (MTBC)
		Aspirados bronqueolaveolares (BAS)		<i>Mycobacterium</i> spp. (NTM)
		Espustos		<i>M. tuberculosis</i> (MTB))

Tabla 5. Lugar, muestra, proceso y diana.

Los valores verdaderos positivos y negativos, los valores de falsos positivos y negativos, la sensibilidad, especificidad, PPV, NPV para VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit fueron calculados en relación con cada ensayo de comparación como se muestra en la siguiente tabla.

Lugar	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	Cultivo	NTM	14	38	0	0	1 (0.76-1)	1 (0.9-1)	1 (0.76-1)	1 (0.9-1)
		MTBC	15	37	0	0	1 (0.78-1)	1 (0.9-1)	1 (0.78-1)	1 (0.9-1)
		MTB	24	27	0	1	0.96 (0.79-0.99)	1 (0.87-1)	1 (0.87-1)	0.96 (0.79-0.99)
	Método de referencia*	Negativo	33	97	0	0	1 (0.89-1)	1 (0.96-1)	1 (0.89-1)	1 (0.96-1)
		NTM	31	99	0	0	1 (0.88-1)	1 (0.96-1)	1 (0.88-1)	1 (0.96-1)
		MTBC	62	67	0	1	0.98 (0.91-1)	1 (0.94-1)	0.98 (0.91-1)	1 (0.94-1)
		MTB	45	79	0	6	0.88 (0.76-0.95)	1 (0.95-1)	1 (0.95-1)	0.88 (0.76-0.95)
	Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test	MTBC	2	325	0	0	1 (0.15-1)	1 (0.98-1)	1 (0.34-1)	1 (0.99-1)
		NTM	5	322	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.98-1)	1 (0.65-1)	(0.99-1)

(Hologic) + smear and culture	MTB	0	327	0	0	NA	1 (0.98 – 1)	NA	1 (0.99 – 1)
-------------------------------------	-----	---	-----	---	---	----	--------------	----	--------------

Tabla 6. Valores de verdadero positivo (TP) y negativo (TN), valores de falso positivo (FP) y falso negativo (FN), sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) para VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit. MTBC = *M. tuberculosis complex* (Complejo *M. tuberculosis*), MTB = *M. tuberculosis*, NTM = non-tuberculosis mycobacteria (micobacterias no tuberculosis).

* La caracterización se llevó a cabo mediante cultivo celular, y además, en pacientes con infección respiratoria por NTM, las especies de NTM se identificaron con INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Fujirebio), mientras que en pacientes con diagnóstico de TB, la identificación de MTBC se realizó con el SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid Test (Abbott).

Los resultados muestran un alto nivel de concordancia para la detección de las dianas utilizando VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción para para las secuencias de inserción IS6110 e IS1081, el gen *16S rRNA* y la región de delección *TbD1* (Figuras 3, 4 y 5).

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).

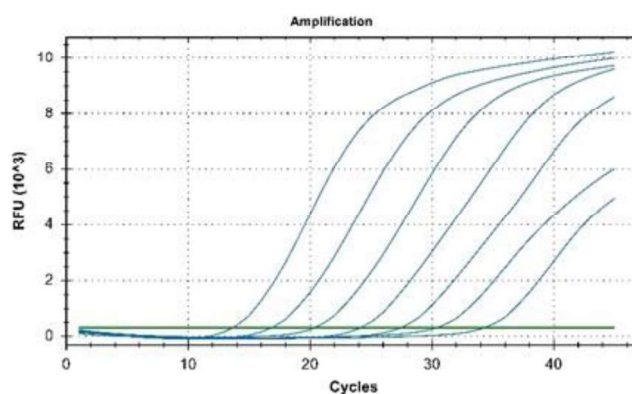


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar del gen 16S rRNA (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal ROX).

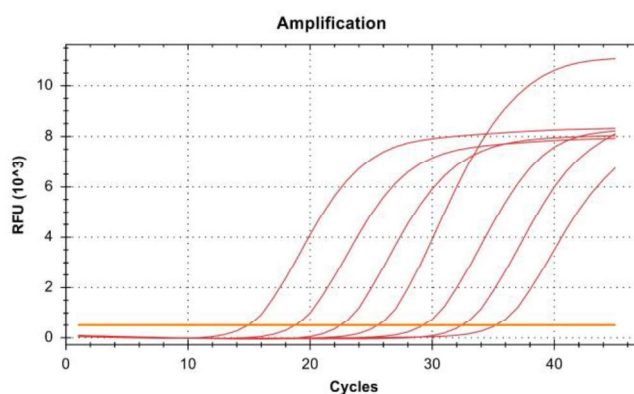
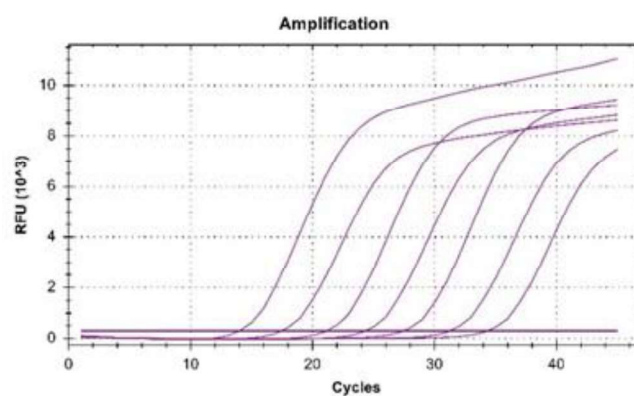


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar de la región de delección *TbD1* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal Cy5).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad de VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* 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.

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

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

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit para la especie de *M. tuberculosis* se evaluó frente a DNA extraído de cepas de referencia (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331 y *Mycobacterium tuberculosis* X004439), y de cepas clínicas que contenían *M. tuberculosis* linajes 1, 2, 3, y linaje 4 (sublinaje T, sublinaje LAM, y sublinaje X), mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit para el género *mycobacterium* se evaluó frente a DNA extraído de cepas de referencia (*Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium xenopi*), de cepas clínicas

(*Mycobacterium tuberculosis* linajes 1, 2, 3, y 4 (sublinaje T, sublinaje LAM, y sublinaje X), *Mycobacterium africanum* linajes 5 y 6, complejo *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, complejo *Mycobacterium chelonae* (grupo III- *M. abscessus*), *Mycobacterium intracellulare*), así como de muestras clínicas (*Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chimaera-intracellulare* mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit para el complejo de *M. tuberculosis* se evaluó frente a DNA extraído de cepas de referencia (*Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*), así como de cepas clínicas (*Mycobacterium tuberculosis* linajes 1, 2, 3, y 4 (sublinaje T, sublinaje LAM, y sublinaje X), y *Mycobacterium africanum* linajes 5 y 6), mostrando resultados positivos.

ANEXO 1

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTD106L
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTD106H
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTD112L
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTD112H
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTD113L
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTD113H
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD136
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD172
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTD101L
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTD101H
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD101

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

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

Diana	Canal	Gen
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	FAM	Secuencias de inserción IS6110 e IS1081
<i>Mycobacterium</i> spp.	ROX	Gen 16S rRNA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cy5	Región de delección <i>TbD1</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 + non-tuberculous mycobacteria 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.cer-test.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria</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 + non-tuberculous mycobacteria</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 + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTD101L, VS-MTD101H, VS-MTD106L, VS-MTD106H, VS-MTD112L y VS-MTD112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria</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 + non-tuberculous mycobacteria</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 + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTD113L y VS-MTD113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	2/9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1. 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTD101, VS-MTD136 y VS-MTD172. 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 + non-tuberculous mycobacteria* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir el *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* Control Positivo reconstituido (vial rojo) o Control Negativo (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

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

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

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

Tabla A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Complejo *M. tuberculosis*), ROX (*Mycobacterium spp.*), Cy5 (*M. tuberculosis*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno(CI)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certets.es).

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTD196T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

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

Diana	Canal	Gen
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	FAM	Secuencias de inserción IS6110 e IS1081
<i>Mycobacterium spp.</i>	ROX	Gen 16S rRNA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cy5	Región de delección TbD1
Control Interno (CI)	HEX, VIC o JOE *	-

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

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

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria</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 + non-tuberculous mycobacteria</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 + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTD196T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

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

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

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

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

Tabla A3. 1. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Complejo *M. tuberculosis*), ROX (*Mycobacterium spp.*), Cy5 (*M.tuberculosis*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno(IC)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certets.es).

ANEXO 3

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTD106LE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTD106HE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTD112LE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTD112HE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTD113LE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTD113HE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD136E
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD172E
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MTD101LE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MTD101HE
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTD101E

Tabla A3. 2. Referencias.

A3.1 Procedimiento

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

Diana	Canal	Gen
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	FAM	Secuencias de inserción IS6110 e IS1081
<i>Mycobacterium</i> spp.	ROX	Gen 16S rRNA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cy5	Región de delección <i>TbD1</i>
Control de Extracción (CE)	HEX, VIC o JOE *	-

Tabla A3. 3. Diana, canal y genes.

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

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria 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 + non-tuberculous mycobacteria</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 + non-tuberculous mycobacteria</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	1/6/12 tiras 8 tapones

Tabla A3. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTD101LE, VS-MTD101HE, VS-MTD106LE, VS-MTD106HE, VS-MTD112LE y VS-MTD112HE.

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

Tabla A3. 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTD113LE y VS-MTD113HE.

Reactivo/Material	Description	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria</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 + non-tuberculous mycobacteria</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. 6. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTD101E, VS-MTD136E y VS-MTD172E. 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 *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir el *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

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

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

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

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

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

Tabla A3. 7. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Complejo *M. tuberculosis*), ROX (*Mycobacterium spp.*), Cy5 (*M. tuberculosis*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (EC)). Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certets.es.

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MTD196TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

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

Diana	Canal	Gen
<i>M. tuberculosis</i> complex	FAM	Two regions of the Insertion sequences IS6110 and IS1081
<i>Mycobacterium</i> spp	ROX	a fragment of the 16S rRNA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cy5	a fragment of <i>TbD1</i> region
Control de Extracción (EC)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A4. 2. Diana, canal y genes.

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

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

Reactivo/Material	Description	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis</i> complex + non-tuberculous mycobacteria 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</i> complex + non-tuberculous mycobacteria 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 *Entamoeba histolytica* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTD196TE.

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 + non-tuberculous mycobacteria* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *M. tuberculosis complex + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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 + non-tuberculous mycobacteria* 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 (*M. tuberculosis complex*), ROX (*Mycobacterium spp.*), Cy5 (*M. tuberculosis*) and HEX, JOE or VIC channels (Control de Extracción (EC)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certets.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción para ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menu Select New Equipment/Advanced Setup/Experiment Properties.

Bibliography/Bibliografía

1. 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. I. Dorronsoro y L. Torroba. Microbiología de la tuberculosis. An. Sist. Navar. 2007 Vol 30, Suplemento 2.
10. Fernando Alcaide Fernández de Vega. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. Control Calidad SEIMC.
11. 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.
12. 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.
13. Gülnur Tarhan. Molecular Diagnostic Test Used in the Diagnosis of Tuberculosis. *Cohesive Journal of Microbiology and Infectious Disease*.
14. Emilia Cercenado y Rafael Cantón. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 9ª. Micobacterias.
15. <https://www.tbfacts.org/tb-tests/>
16. Onno W. Akkerman *et al.* Comparison of 14 molecular assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bronchoalveolar lavage 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.

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / 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. Tabla de Control de Cambios / 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