PROYECTO DE ROTULOS EXTERNOS

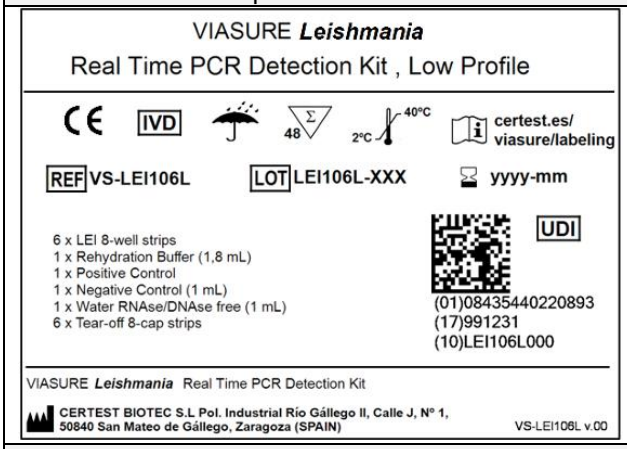
Nombre del producto:

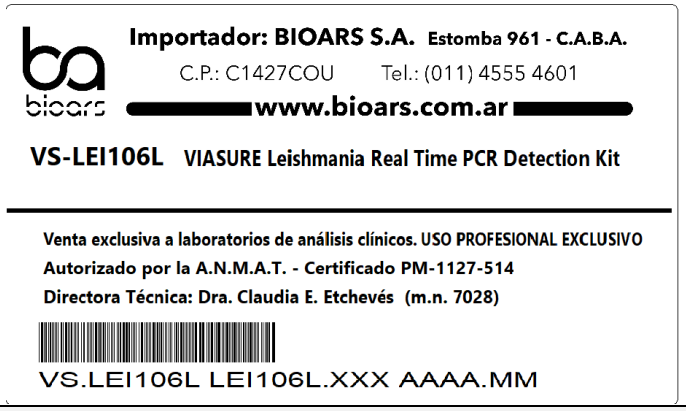
VIASURE Leishmania Real Time PCR Detection Kit

I. Sin control de extracción

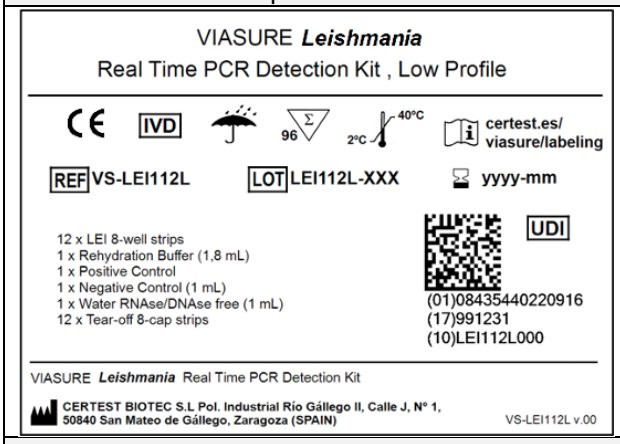
I. 1. Perfil bajo

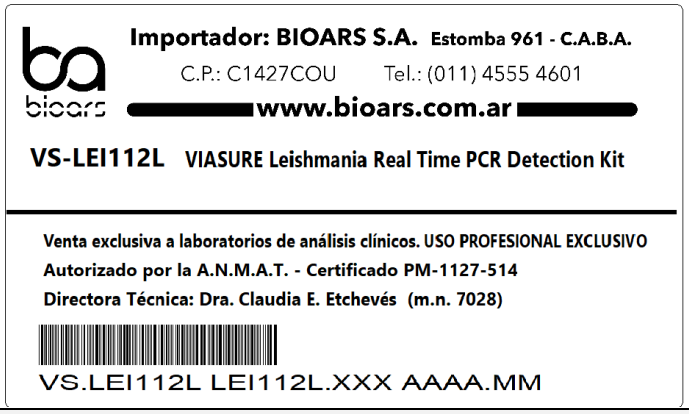
I. 1. a. 6 tiras de 8 pocillos — Sobre-Rótulo



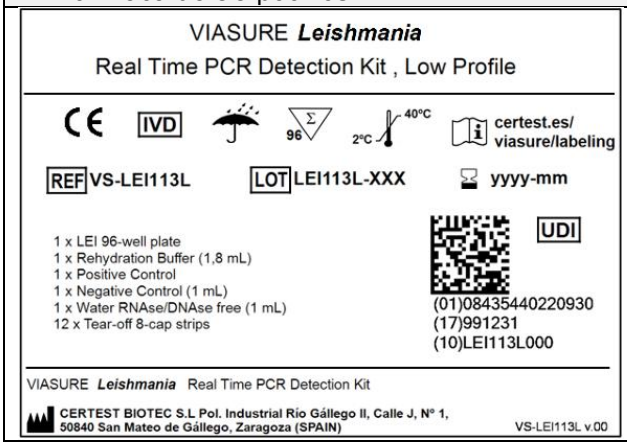


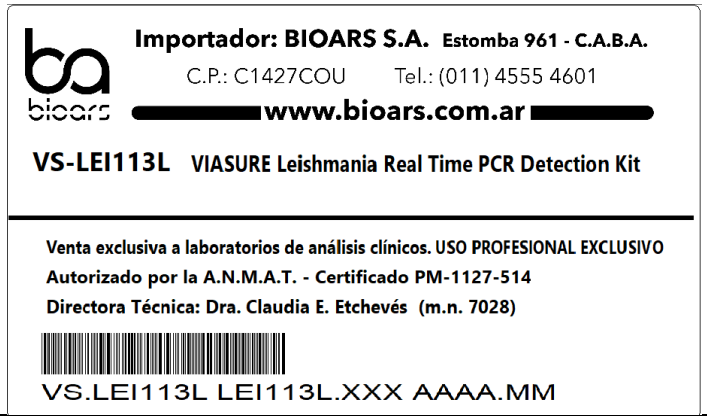
I. 1. b. 12 tiras de 8 pocillos — Sobre-Rótulo





I. 1. c. Placa de 96 pocillos — Sobre-Rótulo

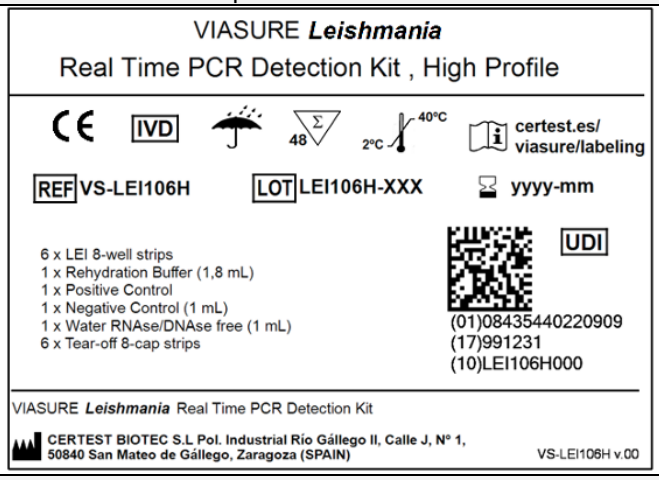




IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

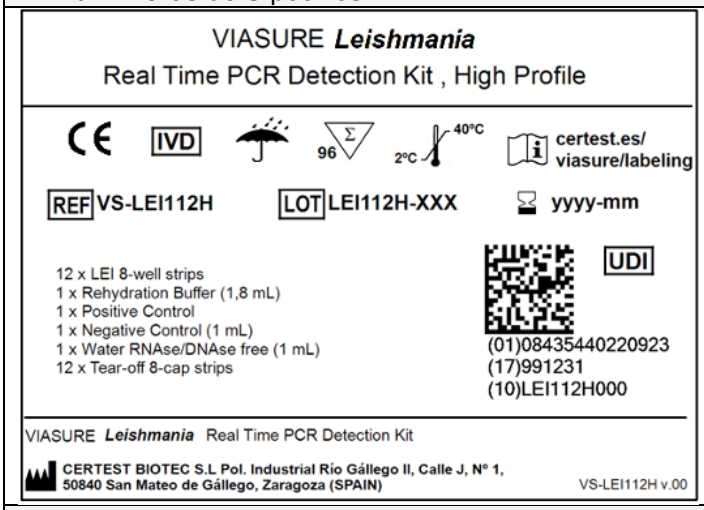
I. 2. Perfil alto

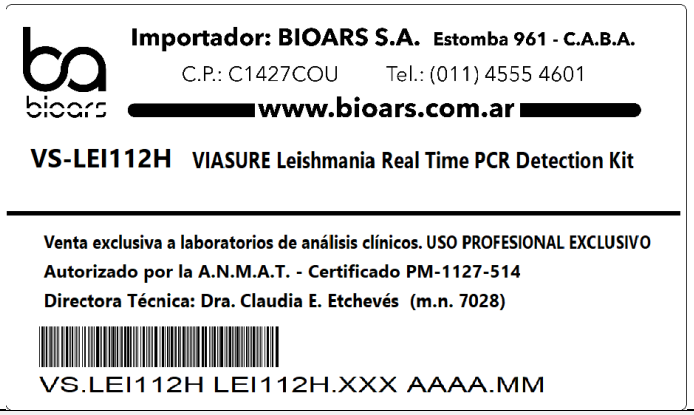
I. 2. a. 6 tiras de 8 pocillos — Sobre-Rótulo



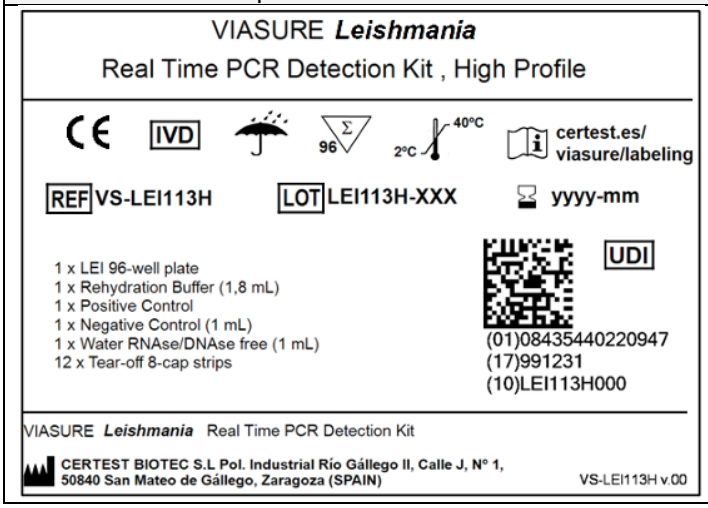


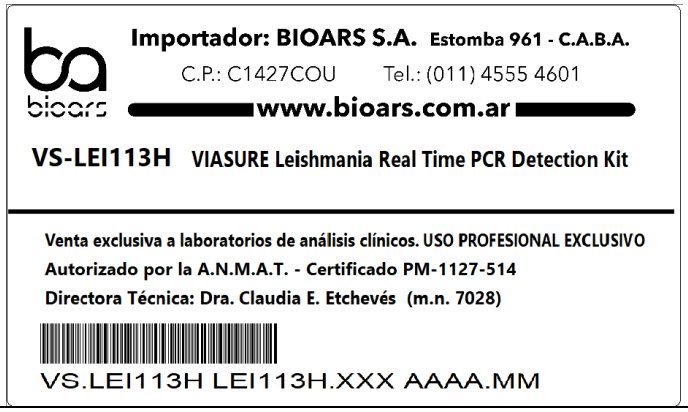
I. 2. b. 12 tiras de 8 pocillos — Sobre-Rótulo





I. 2. c. Placa de 96 pocillos — Sobre-Rótulo



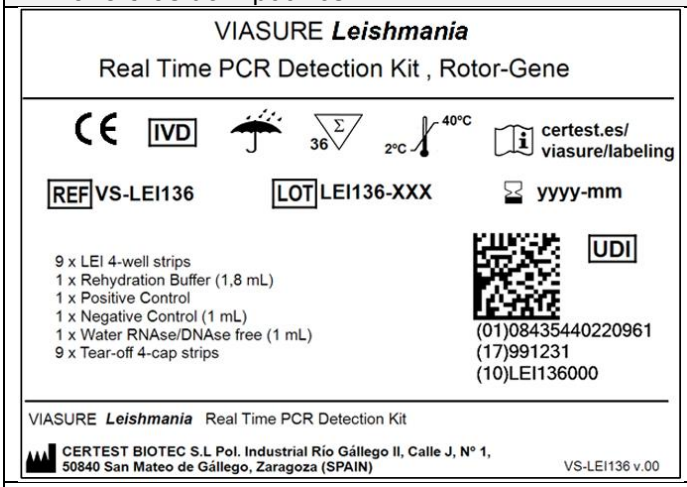


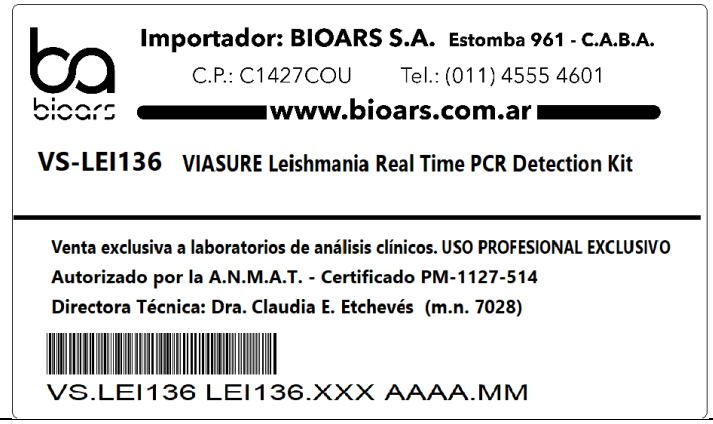
VIASURE Leishmania Real Time PCR Detection Kit

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

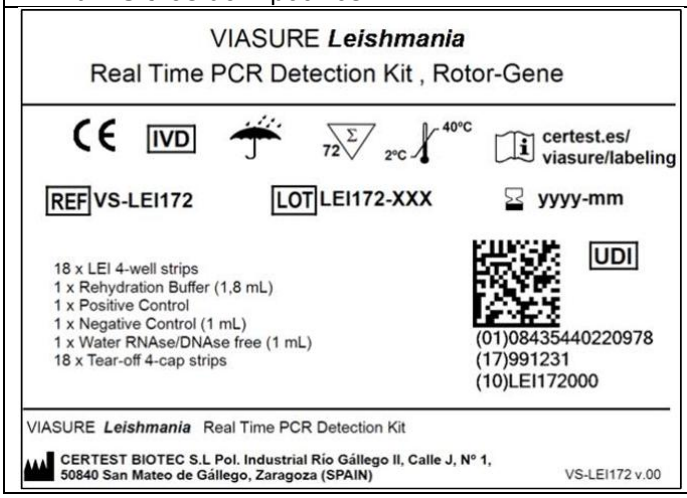
I. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

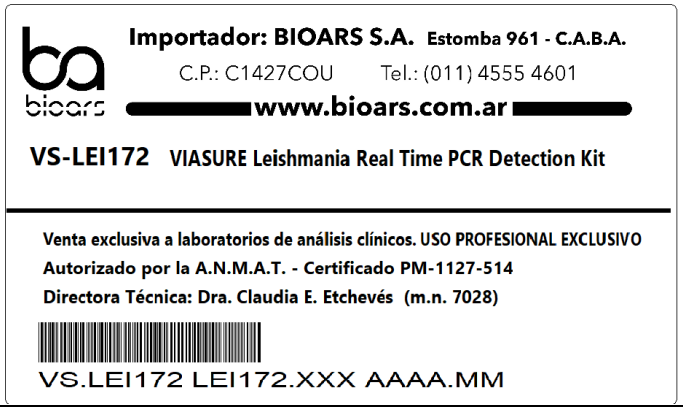
I. 2. a. 9 tiras de 4 pocillos	Sobre-Rótulo





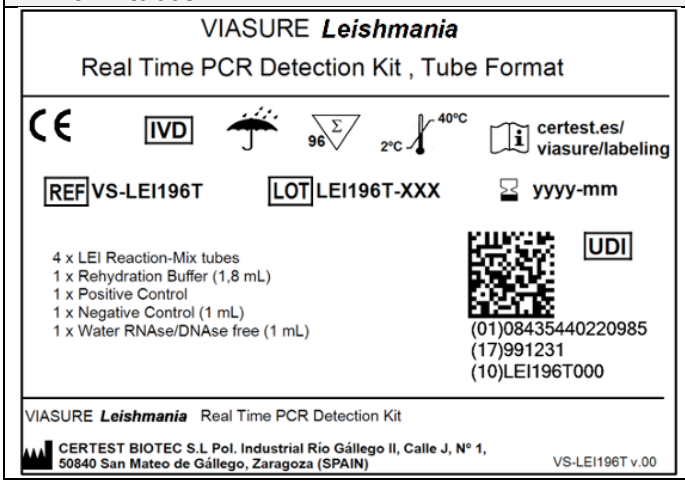
I. 2. b. 18 tiras de 4 pocillos	Sobre-Rótulo

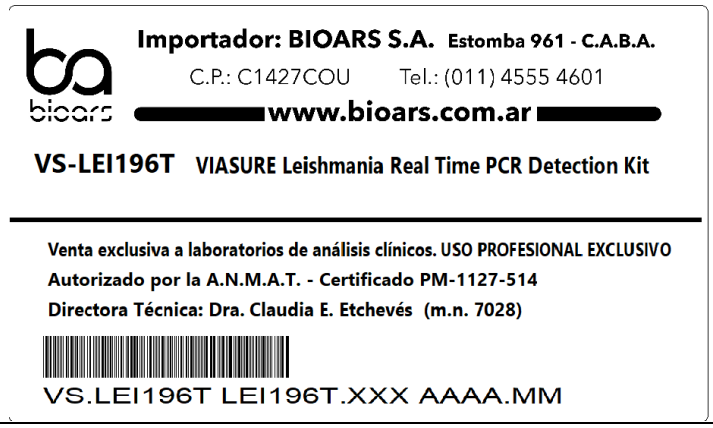




I.4. Tubos con mezcla de reacción

I. 4. a. 4 tubos	Sobre-Rótulo





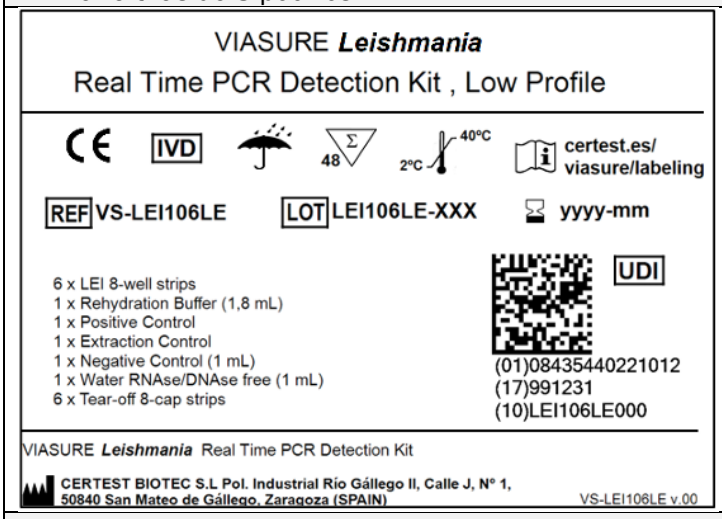
IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

II. Con control de extracción

II. 1. Perfil bajo

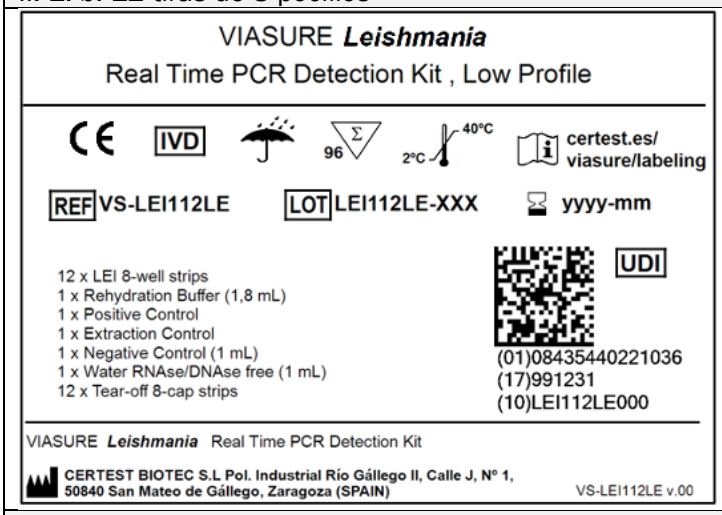
II. 1. a. 6 tiras de 8 pocillos



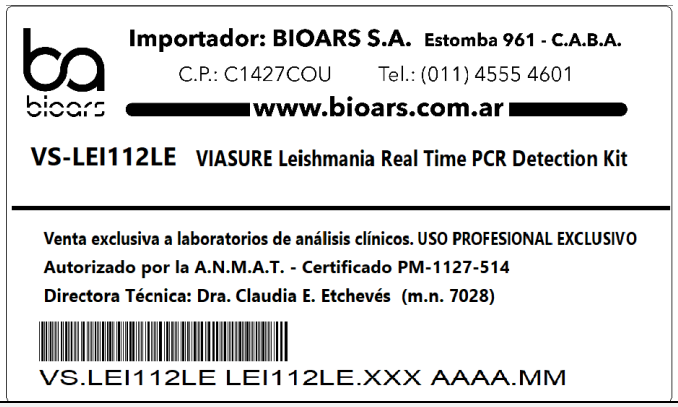
Sobre-Rótulo



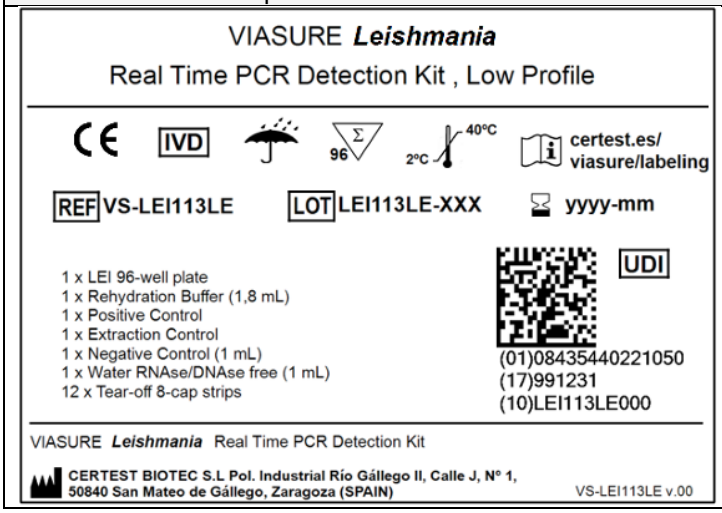
II. 1. b. 12 tiras de 8 pocillos



Sobre-Rótulo



II. 1. c. Placa de 96 pocillos

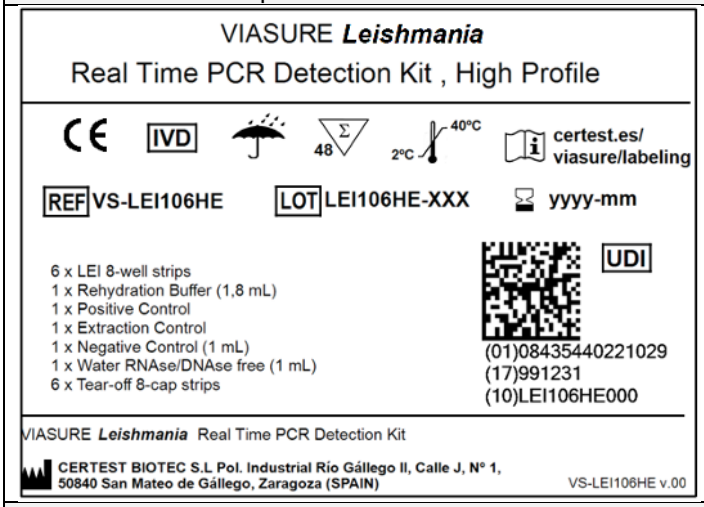
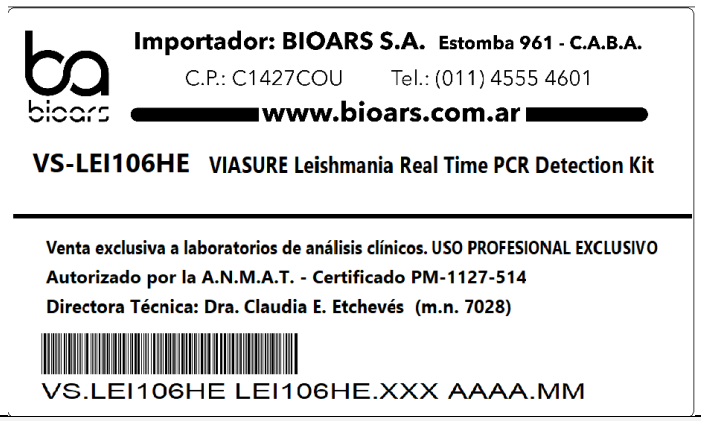
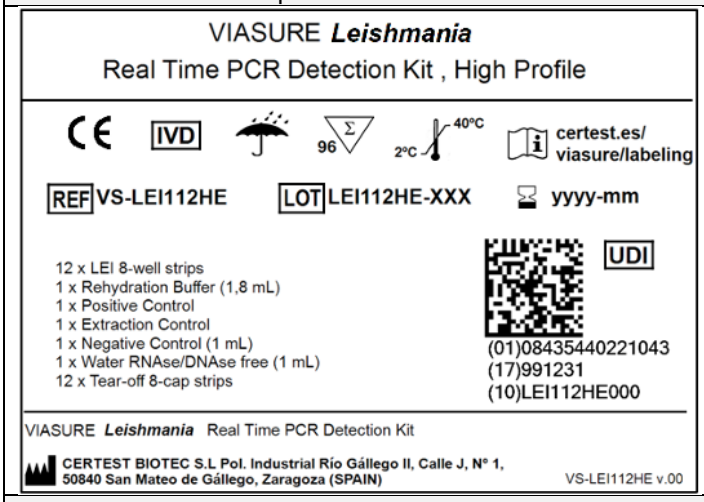
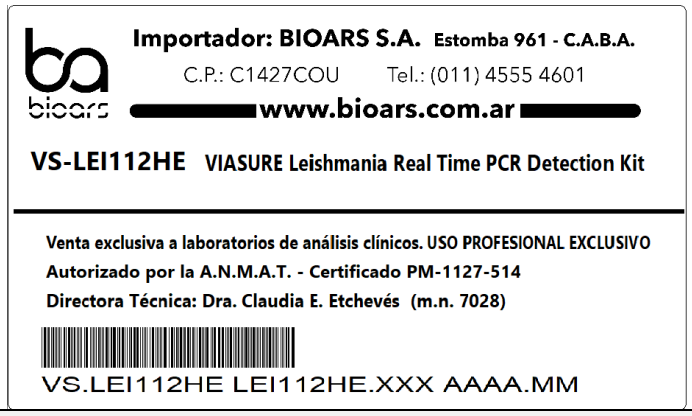
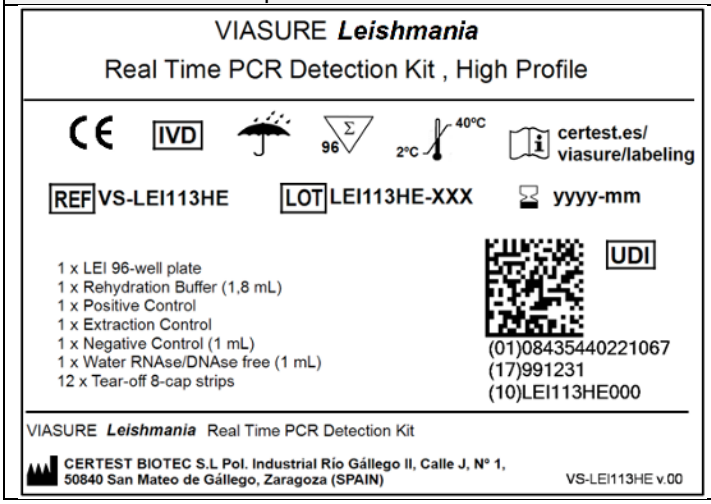
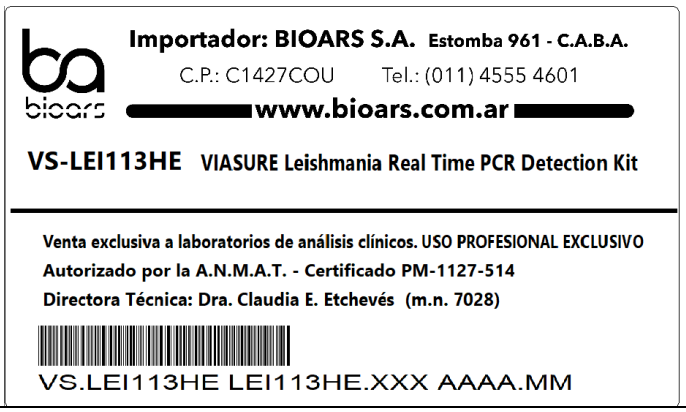


Sobre-Rótulo



IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

II. 2. Perfil alto

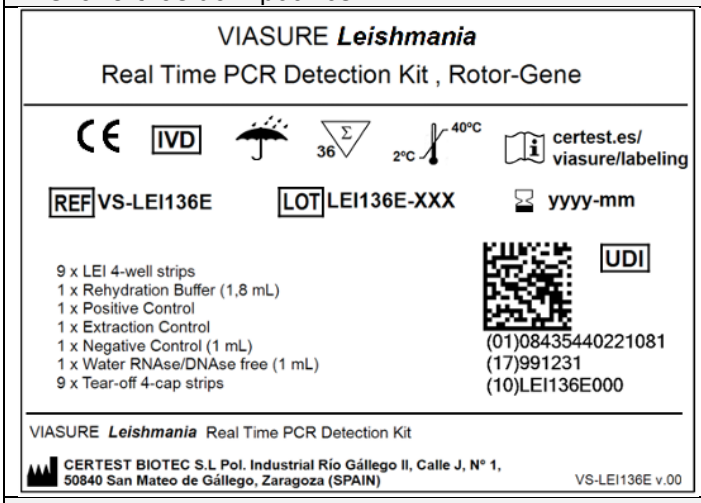
II. 2. a. 6 tiras de 8 pocillos	Sobre-Rótulo
	
II. 2. b. 12 tiras de 8 pocillos	Sobre-Rótulo
	
II. 2. c. Placa de 96 pocillos	Sobre-Rótulo
	

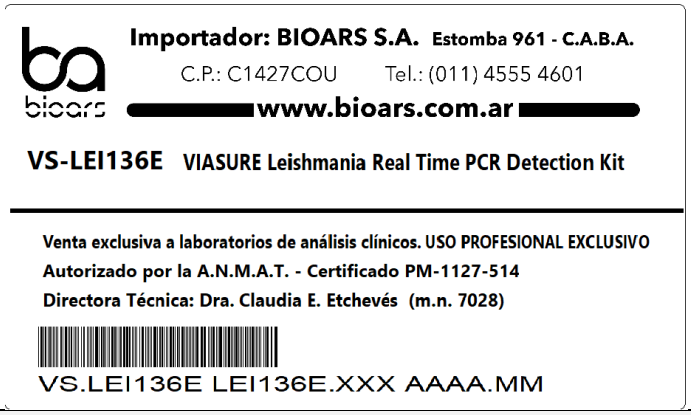
IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

II. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

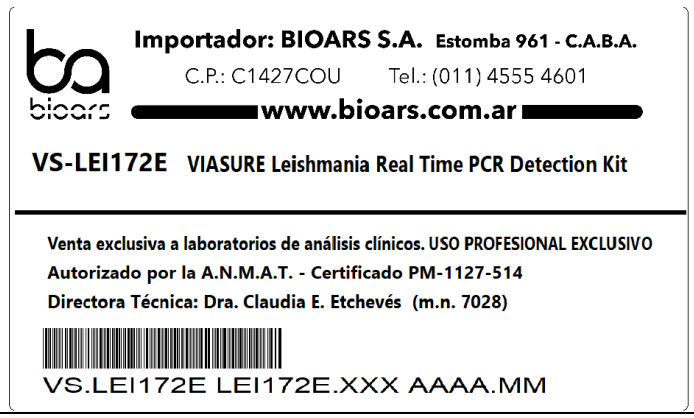
II. 3. a. 9 tiras de 4 pocillos	Sobre-Rótulo





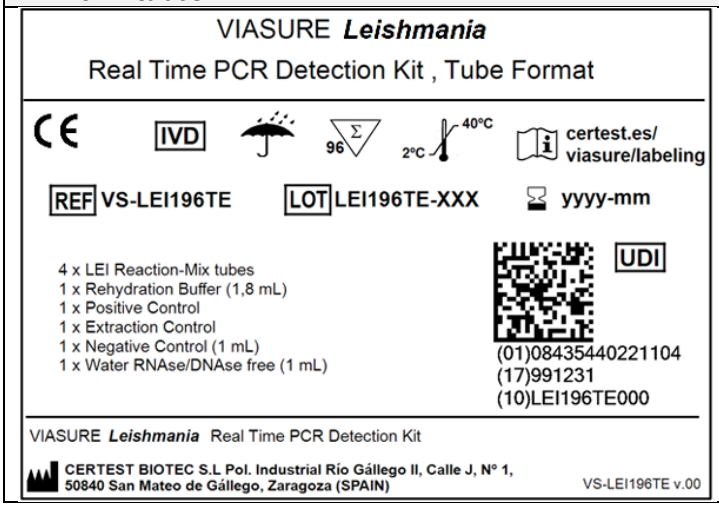
II. 3. b. 18 tiras de 4 pocillos	Sobre-Rótulo

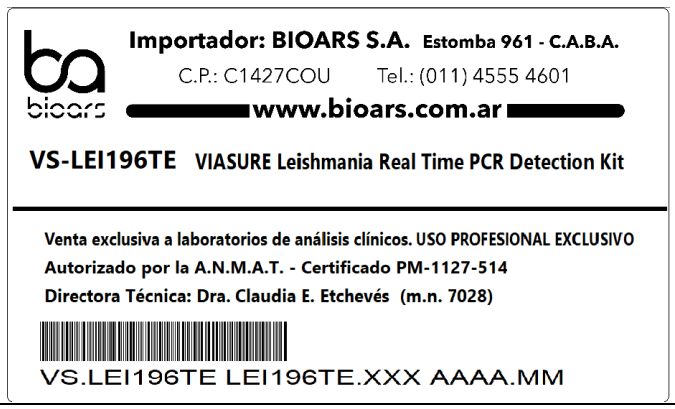




II.4. Tubos con mezcla de reacción

II. 4. a. 4 tubos	Sobre-Rótulo





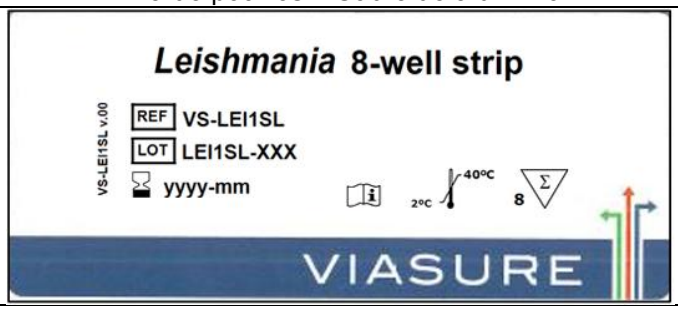
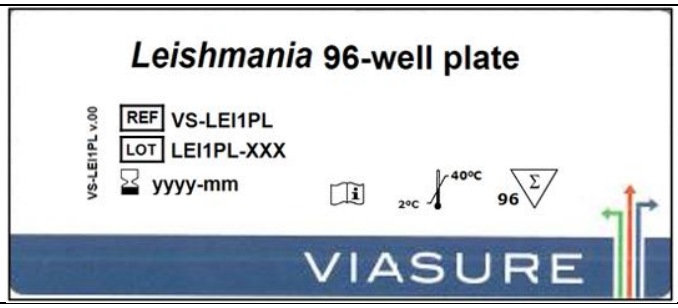
IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

PROYECTO DE ROTULOS INTERNOS

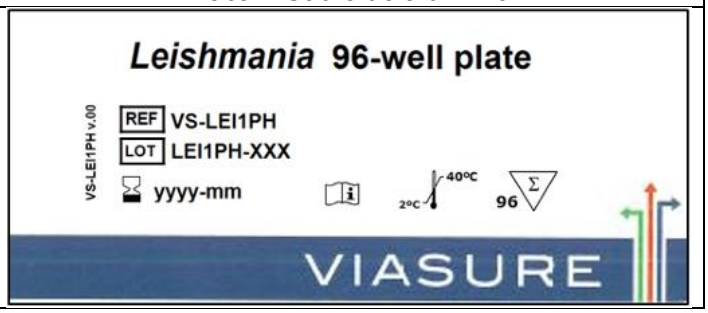
A. VIASURE Leishmania Real Time PCR Detection Kit

I. Sin control de extracción

I. 1. Perfil bajo

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
	

I. 2. Perfil alto

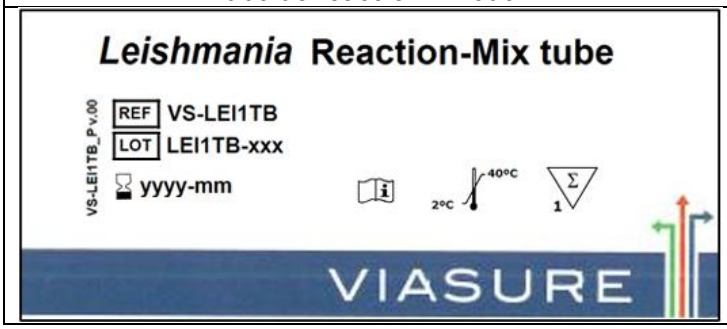
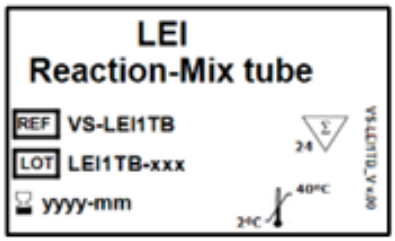
Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
	

I. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

Tira de pocillos – Sobre de aluminio

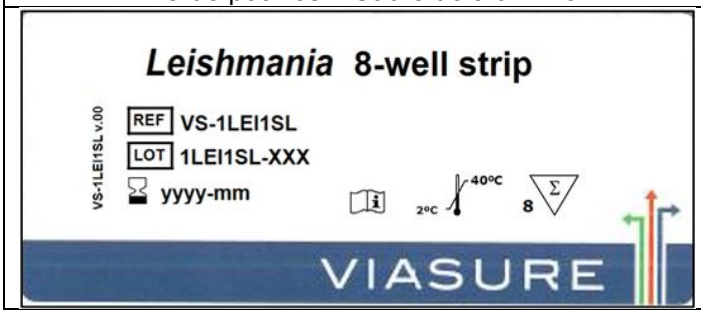

BIOARS S.A.
DIRECTOR TÉCNICO

I. 4. Tubo de reacción

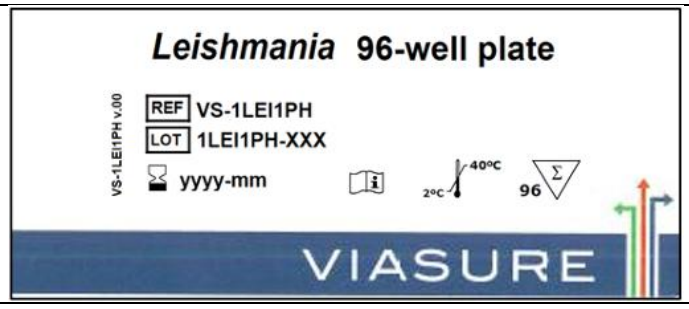
Tubo de reacción – Pouch	Tubo de reacción - Tubo
	

II. Con control de extracción

II. 1. Perfil bajo

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
	

II. 2. Perfil alto

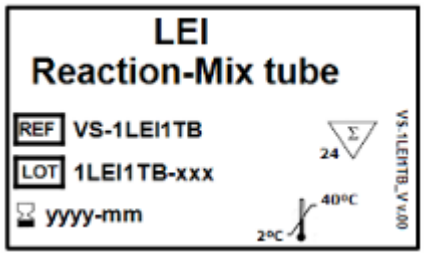
Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
	

II. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

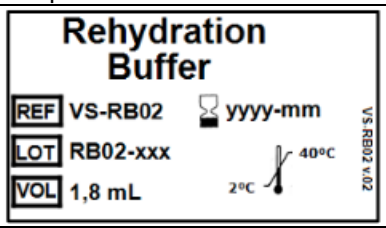
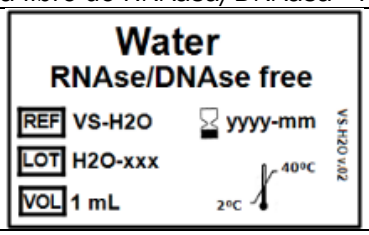
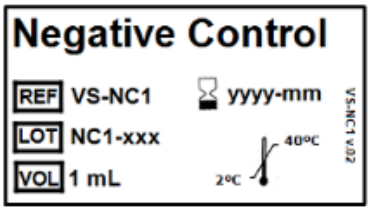
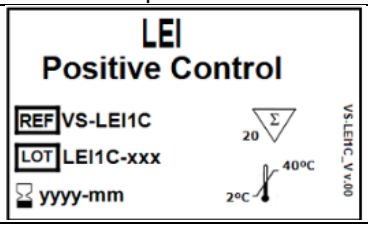
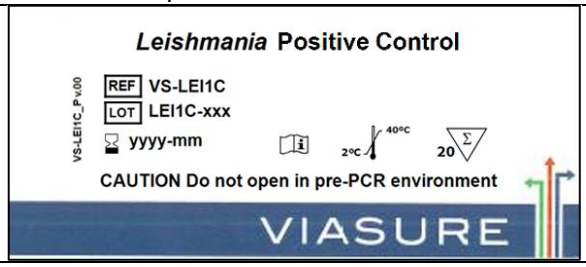
Tira de pocillos – Sobre de aluminio


BIOARS S.A.
DIRECTOR TECNICO

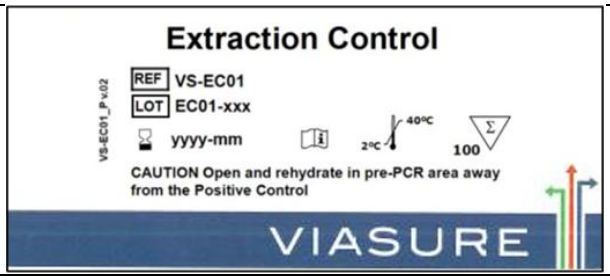
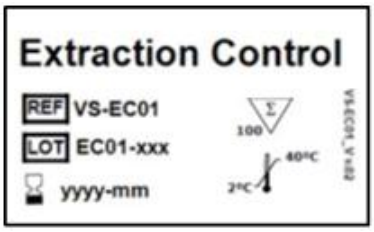
II. 4. Tubo de reacción

Tubo de reacción – Pouch	Tubo de reacción - Tubo
	

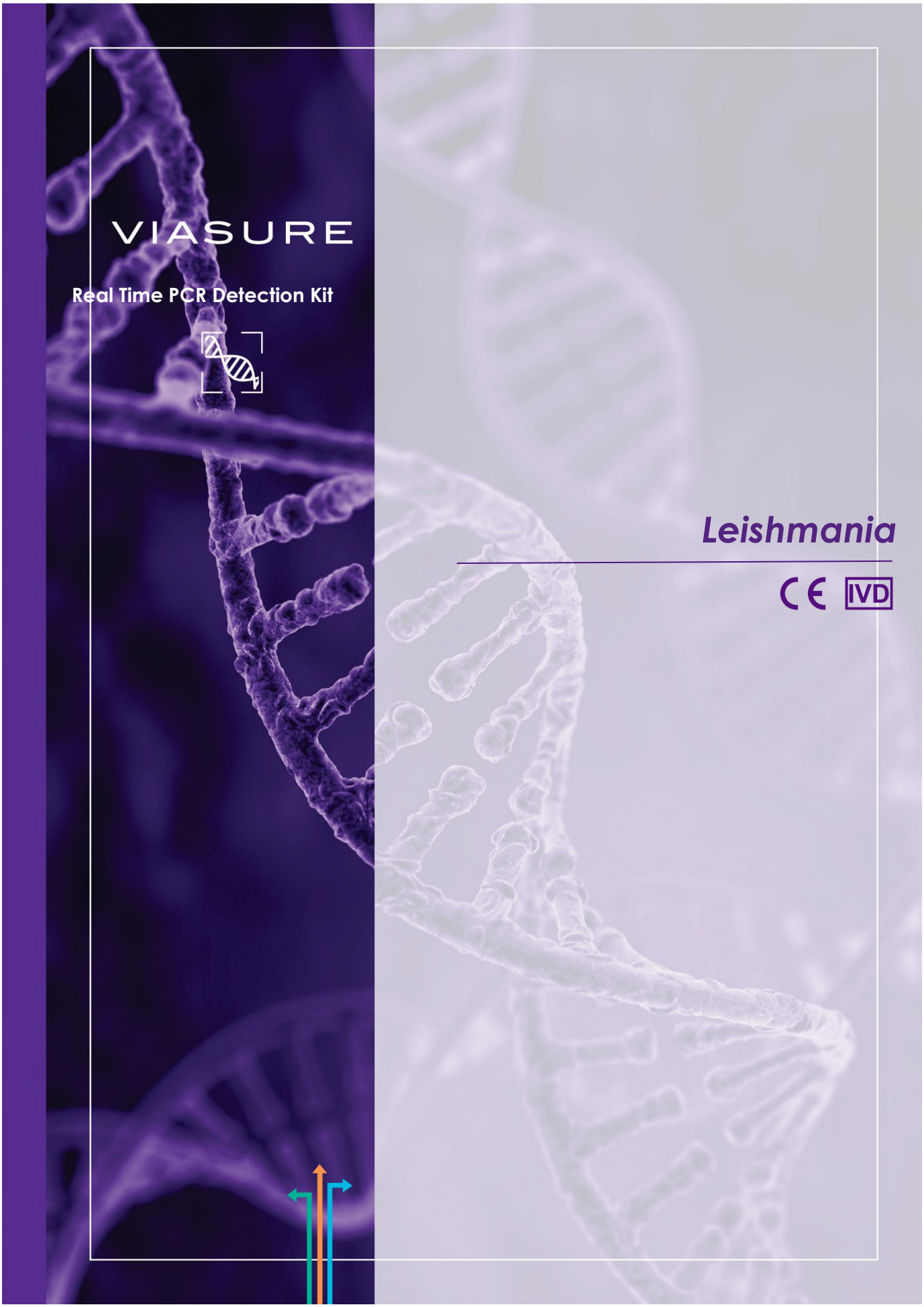
IV. Componentes comunes a todas las presentaciones en todos los productos

Tampón de rehidratación - Tubo	Agua libre de RNAasa/DNAasa - Tubo
	
Control negativo - Tubo	**Control positivo - Tubo**
	
Control positivo – Sobre de aluminio	
	

V. Componente Control de extracción (incluido solo en las presentaciones mencionadas en II, "con control de extracción", de todos los productos)

Control de extracción – Sobre de aluminio	Control de extracción - Tubo
	

BIOARS S.A.
DIRECTOR TECNICO



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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

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

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-LEI106L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-LEI106H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-LEI112L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-LEI112H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-LEI113L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-LEI113H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI136
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI172
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-LEI101L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-LEI101H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI101

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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-LEI196T

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

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

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-LEI106LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-LEI106HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-LEI112LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-LEI112HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-LEI113LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-LEI113HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI136E
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI172E
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-LEI101LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-LEI101HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI101E

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.*

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-LEI196TE

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Content

1. Intended use 6
2. Summary and Explanation 6
3. Principle of the procedure 6
4. Reagents provided 7
5. Reagents and equipment to be supplied by the user 7
6. Transport and storage conditions 8
7. Precautions for users 8
8. Test procedure 10
9. Result interpretation 11
10. Limitations of the test 14
11. Quality control 15
12. Performance characteristics 16
ANNEX 1 20
A1.1 Principle of the procedure 20
A1.2 Reagents provided 20
A1.3 Test procedure 21
ANNEX 2 23
A2.1 Principle of the procedure 23
A2.2 Reagents provided 23
A2.3 Test procedure 23
ANNEX 3 26
A3.1 Principle of the procedure 26
A3.2 Reagents provided 26
A3.3 Test procedure 28
ANNEX 4 30
A4.1 Principle of the procedure 30
A4.2 Reagents provided 30
A4.3 Test procedure 30

Contenido

1. Uso previsto 33
2. Introducción y explicación 33

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
DIRECTOR TECNICO

3. Procedimiento 34
4. Reactivos suministrados 34
5. Material requerido y no suministrado 35
6. Condiciones de transporte y almacenamiento 35
7. Precauciones para el usuario 36
8. Procedimiento del test 37
9. Interpretación de resultados 39
10. Limitaciones del test 41
11. Control de calidad 43
12. Características del test 43
ANEXO 1 47
A1.1 Procedimiento 47
A1.2 Reactivos suministrados 47
A1.3 Procedimiento del test 49
ANEXO 2 51
A2.1 Procedimiento 51
A2.2 Reactivos suministrados 51
A2.3 Procedimiento del test 51
ANEXO 3 54
A3.1 Procedimiento 54
A3.2 Reactivos suministrados 54
A3.3 Procedimiento del test 56
ANEXO 4 58
A4.1 Procedimiento 58
A4.2 Reactivos suministrados 58
A4.3 Procedimiento del test 59
Bibliography/Bibliografía 61
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro* 61
Trademarks 61

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit is a real-time PCR test designed for the qualitative detection of DNA from species of *Leishmania* in skin biopsy, blood and bone-marrow aspirate samples from individuals suspected of *Leishmania spp.* infection (or leishmaniasis) by their healthcare professional (HCP). This test is intended for use as an aid in the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL) in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, amplified using qPCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *Leishmania* species.

2. Summary and Explanation

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by a protozoan parasite from the family *Trypanosomatidae*, order *Kinetoplastida*, genus *Leishmania.* This parasite can infect both humans and other mammals after being bitten by a female phlebotomine sandfly, a tiny 2–3 mm long insect vector. Although asymptomatic infection is the most common outcome after parasite inoculation, more than 20 species of *Leishmania* cause clinical manifestations (disease development), which are classified in three main forms: cutaneous leishmaniasis (CL), visceral leishmaniasis (VL), and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). CL is the most common variety of leishmaniasis worldwide, consisting of ulcers ranging from small-localized lesions to large ulcers all over the body. There may be many lesions, leading to disfiguring and/or incapacitating scars. *Leishmania* parasites causing CL are commonly divided into Old World species (like *L. major*, *L. tropica*, and *L. aethiopica*, that are prevalent around the Mediterranean Basin, the Middle East, the Horn of Africa, or the Indian subcontinent) and New World species (like *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, and *L. guyanensis*, endemic in Central and South America). These parasites are classified in one of two subgenera, *Leishmania* or *Viannia*, based on the site of development and attachment of the protozoa in the sandfly gut. MCL, often considering as a form of CL, is a potentially life-threatening and highly disfiguring condition due to the late-stage destruction of the oronasopharyngeal mucosa and cartilage, occasionally affecting the larynx, leading to aspiration pneumonia. 1-10% of MCL cases are caused after infection by a strain from the *Vianna* subgenera (*L. braziliensis* and *L. panamensis*, and, sometimes, *L. guyanensis* and *L. amazonensis*). VL comprises irregular bouts of fever, significant weight loss, swelling of the spleen and liver and serious anemia. This leishmaniasis form is caused by *L. donovani* in Asia and Africa, and *L. infantum* in the Mediterranean Basin, the Middle East, central Asia, South America and Central America, and its fatality rate can be as high as 100% within 2 years if it is not treated.

Leishmaniasis has been historically widespread in tropical climates across multiple territories. It is endemic in Asia, the Middle East, Northern Africa, the Mediterranean and South and Central America, being found in 89 countries. 1.5 to 2 new million new cases occur worldwide annually, and 70,000 deaths per year are attributed to this disease. According to the WHO, the majority of new VL cases reported worldwide in 2018 were in Brazil, Sudan, South Sudan, Ethiopia, India, and Kenya. Likewise, the corresponding to CL reported worldwide in 2018 were in Brazil, Bolivia, Peru, Colombia, Algeria, Tunisia, Iraq, Syria, Iran, Turkmenistan, and Afghanistan.

The diagnosis of leishmaniasis has been carried out traditionally by combination of direct and indirect diagnostic methods. Histopathologic examination under the microscope of fixed tissues, biopsies, or *in vitro* culture to detect amastigote parasite stage are considered the gold standard of diagnosis. However, the sensitivity of direct observation depends on the tissue, making necessary the utilization of alternative techniques. Several serological

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

assays are available, including direct agglutination test, ELISA, immunofluorescence and western blot, but should be interpreted in the context of clinical history. Molecular methods based on amplification of nuclear or kinetoplast DNA are very sensitive and allow for the identification of the *Leishmania* species. Molecular tests are especially important where simpler techniques fail (eg., in mucosal lesions where parasites are sporadic, and in chronic lesions). PCR platforms show sensitivity values between 92 and 100% and specificity of 100%. Other targets have been selected for PCR assays, such as Heat Shock Protein 70 kDa (HSP70), the internal transcribed spacer 1 (ITS-1), or the small 18S ribosomal subunit. The 18S rRNA region, part of the eukaryotic ribosome small subunit (SSU), is commonly utilized for the diagnosis of different *Leishmania* species, reflecting its highly conserved nature.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit is designed for the qualitative detection of DNA from *Leishmania spp.* in skin biopsy, blood and bone-marrow aspirate samples. After DNA isolation, the detection of *Leishmania spp.* is performed by the amplification of a conserved region of the *18S rRNA* gene of *Leishmania spp.* using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

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

4. Reagents provided

VIASURE *Leishmania* 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit.

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

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1 and 3).

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Roche Molecular Diagnostics LightCycler ® 480, Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Linear NEOS-96 Real Time PCR System, Bioer Technology QuantGene 9600, Applied Biosystems QuantStudio®6 instrument, and Qiagen Rotor-Gene® Q. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506). To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

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

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

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

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

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40ºC until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. 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 *Leishmania* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25ºC±5ºC or 2ºC to 8ºC for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at –20ºC 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.

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Presidente

- 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-LEI113L, VS-LEI113H, VS-LEI136, VS-LEI172, VS-LEI113LE, VS-LEI113HE, VS-LEI136E and VS-LEI172E). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-LEI136, VS-LEI172, VS-LEI136E and VS-LEI172E (compatible for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit has been tested in skin biopsy, blood and bone-marrow aspirate samples. Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, clinical samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at the following temperature conditions recommended by CDC following the local and national regulations for the transport of pathogen material.

- Skin biopsies: in sterile buffer medium at RT < 48h or at 2-8°C >48h and in sterile container at 2-8°C < 24 h.
- Blood samples and bone-marrow aspirates: <2h at RT or >2h at -80°C.

For long term transport (more than 2 hours), it is recommended shipping at -20°C or lower.

It is also recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 2 hours or frozen at -20°C or ideally at -80°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/resources/pdf/Leishmaniasis_Guide_Submission_2021.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), García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)* and Bruschi, F., & Gradoni, L. (Eds.). (2018). The leishmaniases: old neglected tropical diseases. *Springer*.

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

8.2. DNA extraction

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

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

- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- EZ1 DNA tissue kit using the EZ1 Advanced automated instrument (QIAGEN).
- EZ1 DNA blood kit using the EZ1 Advanced automated instrument (QIAGEN).
- High Pure PCR purification kit for tissue samples (Roche Diagnostics).
- Speedtools DNA Extraction kit (Biotools).

9. Result interpretation

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

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

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Leishmania spp.* in the positive control well.

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

Controls	*Leishmania spp.* (FAM)[1]	Internal control (HEX)[2]	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	**Valid**
Negative Control (NC)	≥40 or no signal	≤40	**Valid**

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

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

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

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

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

Leishmania spp. (FAM)	Internal control (HEX)	Interpretation for patients' individual samples
≤40	≤40 or no signal [1]	***Leishmania spp.* DNA Detected**
≥40 or no signal	≤ 35 [2]	***Leishmania spp.* DNA not Detected [2]**
≥40 or no signal	≥ 35 or no signal [2]	**Test Failure – Repeat Testing [2]**

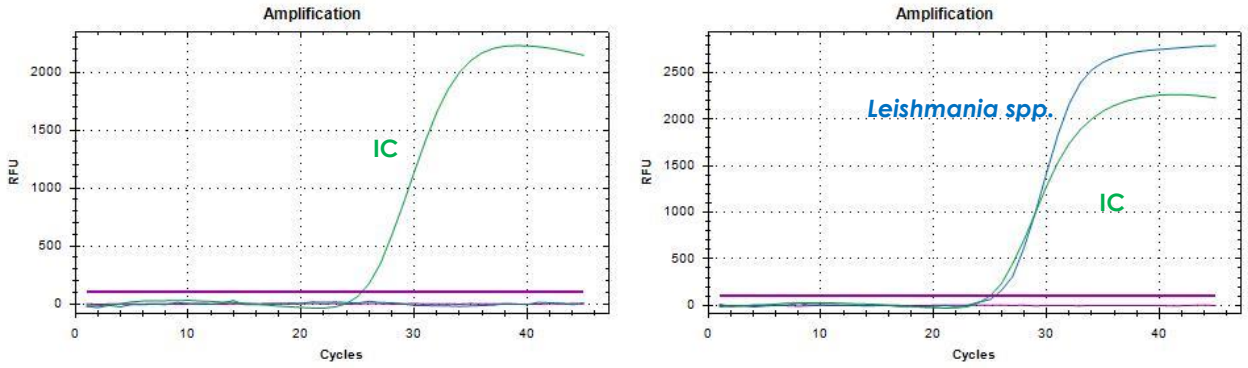
Table 2. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve.

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

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

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

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



Negative control **Positive control**

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

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

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Profesional
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Controls	*Leishmania spp.* (FAM)[1]	Extraction Control (HEX)[2]	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	**Valid**
Negative Control (NC)	≥40 or no signal	≤40	**Valid**

Table 3. Expected Performance of Controls. Ct no signal = no amplification curve.

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

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

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

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

Leishmania spp. (FAM)	Extraction control (HEX)	Interpretation for patients' individual samples
≤40	≤40 or no signal [1]	***Leishmania spp.* DNA Detected**
≥40 or no signal	≤ 35 [2]	***Leishmania spp.* DNA not Detected [2]**
≥40 or no signal	≥ 35 or no signal [2]	**Test Failure – Repeat Testing [2]**

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

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

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

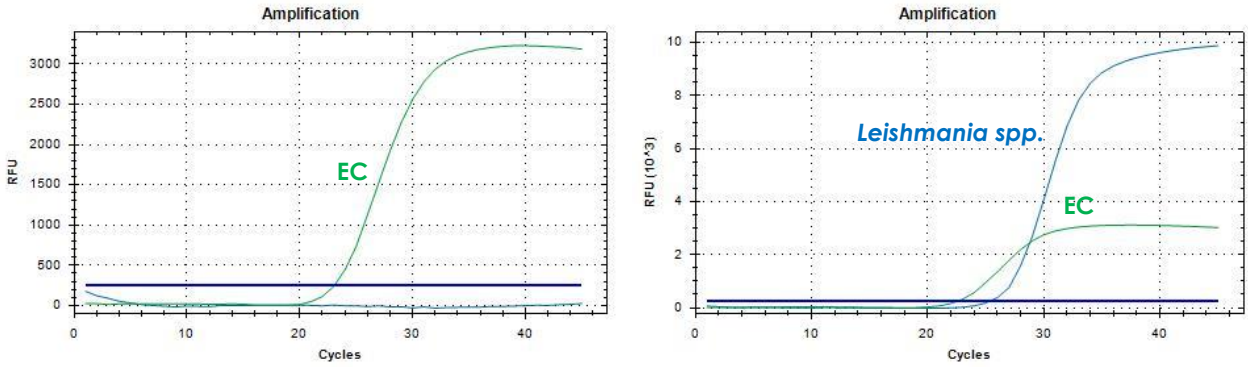
In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user, to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

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



Negative control **Positive control**

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with DNA extracted from skin biopsy, blood and bone-marrow aspirate samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; properly extracted nucleic acid from clinical samples must be done.
- 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 *Leishmania spp.*, either the high number of DNA template copies which contains each *Leishmania* Positive Control vial, 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 *Leishmania* Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNAse/DNAse free (white vial). Each procedure must take place in established order and in a separate laboratory areas.
- The specific primer and probe combinations for detection of the *18S rRNA* gene used in VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit designed for the detection of *Leishmania spp.*, do not show significant combined homologies with the human genome or human microflora, which might result in predictable false positive.
- 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 protozoan DNA during sample shipping/storage and/or processing.
    - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *Leishmania* variants.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

- A protozoan load in the specimen below the limit of detection for the assay.
- The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of any kind of drugs used to prevent leishmaniasis 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 protozoa and does not imply that these protozoa are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of protozoan target sequences (*18S rRNA* gene).
- Negative results do not preclude leishmaniasis and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak protozoan levels during infections caused by *Leishmania spp.* 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 vector-borne illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that leishmaniasis 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.
- Analysis *in silico* of the primers and probe alignments showed that VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit detects the following species of *Leishmaniinae* subfamily, with no clinical relevance for leishmaniasis diagnosis:

Number of analyzed sequences	**983** *L. aethopica* *L. amazonensis* *L. braziliensis* *L. chagasi* *L. donovani* *L. gerbilli* *L. guyanensis* *L. infantum* *L. major* *L. mexicana* *L. panamensis* *L. tropica* *L. turanica*
Max Fw mismatches	0
Max Rv mismatches	0
Max probe mismatches	0
Species detected without mismatches	*Crithidia expoeki* *Crithidia bombi* *Crithidia brevicula* *Crithidia mellificae*
Species detected with mismatches	*Lotmaria passim*

Table 5. Analysis *in silico* of primers and probe designed for *Leishmania spp.* detection.

11. Quality control

VIASURE *Leishmania* 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.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit was tested using clinical samples (skin biopsy samples and visceral samples) from patients with suspicion of leishmaniasis. In order to determine the clinical diagnostic accuracy, multicenter evaluations have been conducted through collaboration with national entities. A summary of the sites, sample type and workflow is included in the following table:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Certest Biotec and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Madrid, Spain)	Al type of clinical samples	Speedtools DNA Extraction kit (Biotools) + Applied Biosystems 2720 thermal cycler + DNA Technologies DTlite Real-Time PCR System + Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	*Leishmania spp.*
1.A		Skin biopsy samples		
1.B		Peripheral blood samples		
1.C		Bone-marrow aspirate samples		
2	'Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau' and University of Barcelona, (Barcelona, Spain)	Al type of clinical samples	EZ1 DNA tissue kit and EZ1 DNA blood kit (QIAGEN) using the EZ1 Advanced automated instrument + High Pure PCR purification kit for tissue samples (Roche Diagnosis) + Applied Biosystems QuantStudio®6 instrument	*Leishmania spp.*
2.A		Skin biopsy samples		
2.B		Visceral clinical samples		

Table 6. Summary of the sites, sample type and workflow carried out during the clinical evaluation.

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

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	Nested-PCR: Ln-PCR as described by Cruz et al.2002[1], 2006[2]	*Leishmania spp.*	88	79	0	0	1 (0.95-1)	1 (0.95-1)	1 (0.95-1)	1 (0.95-1)
1.A			35	26	0	0	1 (0.90-1)	1 (0.86-1)	1 (0.90-1)	1 (0.86-1)
1.B			26	26	0	0	1 (0.86-1)	0.96 (0.86-1)	1 (0.86-1)	0.96 (0.86-1)
1.C			27	27	0	0	1 (0.87-1)	1 (0.87-1)	1 (0.87-1)	1 (0.87-1)
2	Reference algorithm *	*Leishmania spp.*	27	21	1	0	1 (0.87 – 1)	0.95 (0.77 – 0.99)	0.96 (0.79 – 0.99)	1 (0.80 – 1)
	Leishmania spp. Real-TM PCR kit (Sacace biotechnologies)		28	16	0	5	0.84 (0.63 – 0.94)	1 (0.79 – 1)	1 (0.84 – 1)	0.76 (0.52 – 0.90)
2.A	Reference algorithm *		23	20	1	0	1 (0.85-1)	0.95 (0.76-0.99)	0.95 (0.76-0.99)	1 (0.79-1)
	Leishmania spp. Real-TM PCR kit (Sacace biotechnologies)		24	16	0	4	0.85 (0.67 – 0.96)	1 (0.79 – 1)	1 (0.82 – 1)	0.80 (0.55-0.93)
2.B	Reference algorithm *		4	1	0	0	1 (0.39 – 1)	1 (0.02 – 1)	1 (0.39 – 1)	1 (0.02 – 1)
	Leishmania spp. Real-TM PCR kit (Sacace biotechnologies)		4	0	0	1	0.8 (0.28-0.99)	n.a.#	1 (0.47-1)	n.a.#

Table 7. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit.

 # Due to the lack of true negative samples, the calculation of the clinical specificity of the test could not be performed.
*** Reference algorithm: Light microscopy + sample culture using the NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) and the Schneider Drosophyla media + In-house real-time PCR as described by Mary et al. 2004[3] with variations according to Martin-Ezquerra et al., 2009[4] and Velez et al., 2020[5].**

1 Cruz, I., Canavate, C., Rubio, J.M., Morales, M.A., Chicharro, C., Laguna, F., Jimenez-Mejias, M., Sirera, G., Videla, S., Alvar, J., Spanish HIV-Leishmania Study Group. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring Leishmania infantum infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96, S1/185-S1/189.
2 Cruz, I., Chicharro, C., Nieto, J., Bailo, B., Cañavate, C., Figueras, M.C., Alvar, J. (2006) Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol, 44*(7), 2343-7.
3 Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., et al. (2004) Quantification of Leishmania infantum DNA by a rea-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clinic Microbiol, 42*, 5249-55. doi: 10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004.
4 Martín-Ezquerra, G., Fisa, R., Riera, C., Rocamora, V., Fernández-Casado, A., Barranco, C., Serra, T., Baró, T., Pujol, R.M. (2009) Role of Leishmania spp. infestation in nondiagnostic cutaneous granulomatous lesions: Report of a series of patients from a Western Mediterranean area. *British Journal of Dermatology 161*, 320–325. doi: 0.1111/j.1365-2133.2009.09282.x.
5 Velez, R., Domenech, E., Rodríguez-Cortés, A., Barrios, D., Tebar, S., Fernández-Arévalo, A., Aguilar, R., Dobaño, C., Alberola, J., Cairó, J., Gállego, M. (2020). Evaluation of canine leishmaniosis vaccine CaniLeish® under field conditions in native dog populations from an endemic Mediterranean area – a randomized controlled trial. *Acta Tro*, doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105387.

The results show high agreement to detect *Leishmania spp.* using VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit.

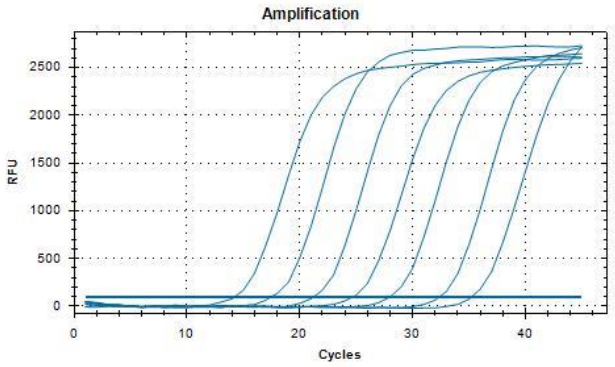
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
DIRECTOR TECNICO

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of 10 genome copies per reaction for *Leishmania spp.* (*18S rRNA* gene) with a positive rate of ≥95% on blood samples.

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



12.3. Analytical specificity

The specificity of *Leishmania spp.* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms associated to blood-borne diseases. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing					
Anaplasma marginale	-	Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	St Louis Encephalitis virus	-
Bartonella henselae strain *Houston-1*	-	Chikungunya virus F24	-	*Theileria annulata*	-
Borrelia hermsii	-	*Coxiella burnetii* strain *Nine Mile Q*	-	Tick-Borne Encephalitis virus strain Neudorfl	-
Borrelia lusitianae	-	Dengue virus serotype 1 strain Hawaii A	-	*Treponema phagedenis*	-
Borrelia valaisiana	-	Dengue virus serotype 2 strain New Guinea C	-	*Trypanosoma cruzi*	-
Borrelia azfelii strain *P-Ko/1984*	-	Dengue virus serotype 3 strain H87	-	West Nile virus strain NY99	-
Borrelia bavariensis	-	Dengue virus serotype 4 strain H241	-	West Nile virus strain Heja	-
Borrelia bisetti	-	Japanese Encephalitis virus	-	West Nile virus strain Ug37	-
Borrelia burgdorferi strain *IRS*	-	Japanese Encephalitis virus strain Nakayama	-	Yellow Fever virus strain 17D	-
Borrelia burgdorferi sensu stricto strain *B31*	-	*Leptospira*	-	Yellow Fever virus strain French Neurotropic	-
Borrelia garinii Type strain	-	*Plasmodium falciparum* strain *3D7*	-	Zika FB-GWUH-2016	-
Borrelia japonica	-	*Rickettsia conorii* strain *Moroccan*	-	Zika virus African strain	-
Borrelia miyamotoi	-	Rift Valley Fever Virus strain AR21229	-	Zika virus Asian strain PF13/251013-18	-
Borrelia spielmanii	-	Rift Valley Fever Virus strain MP12	-	Zika Virus French Polynesian strain 11468/16	-

Table 8. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen
Presidente

BIOARS S.A.
CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against synthetic DNA, and against DNA extracted from clinical samples infected by different species of *Leishmania*: *L. infantum, L. major, L.mexicana, L. tropica,* and subgenus *L. Viannia* (*L. braziliensis* and *L. panamensis*), showing positive results.

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

ANNEX 1

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-LEI106L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-LEI106H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-LEI112L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-LEI112H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-LEI113L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-LEI113H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI136
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI172
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-LEI101L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-LEI101H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI101

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

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

Target	Channel	Gene
Leishmania spp.	FAM	*18S rRNA* gene
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A1 2. Target, channel and genes.

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

A1.2 Reagents provided

VIASURE *Leishmania* 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).

BIOARS S.A.

BIOARS S.A.
DIRECTOR TECNICO

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-LEI101L, VS-LEI101H, VS-LEI106L, VS-LEI106H, VS-LEI112L and VS-LEI112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-LEI113L and VS-LEI113H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Leishmania 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
Leishmania 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	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/9/18 x 4-cap strip

Table A1 5. Reagents and materials provided in VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-LEI101, VS-LEI136 and VS-LEI172. 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

Leishmania 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 *Leishmania* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNAse/DNAse free (white vial) and vortex thoroughly.

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. 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 *Leishmania* 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	95ºC
45	Denaturation	10 sec	95ºC
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60ºC

Table A1 6. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*18S rRNA* gene) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-LEI196T

Table A2. 1.References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE *Leishmania* 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 monitor the PCR inhibition.

Target	Channel	Gene
Leishmania spp.	FAM	*18S rRNA* gene
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A2. 2.Target, channel and genes.

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

A2.2 Reagents provided

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

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-LEI196T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

Leishmania 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 *Leishmania* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNAse/DNAse free (white vial) and vortex thoroughly.

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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 *Leishmania* 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 *Leishmania* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Leishmania* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. Centrifuge briefly.

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

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

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

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

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*18S rRNA* gene) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

ANNEX 3

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-LEI106LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-LEI106HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-LEI112LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-LEI112HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-LEI113LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-LEI113HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI136E
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI172E
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-LEI101LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-LEI101HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI101E

Table A3. 1. References.

A3.1 Principle of the procedure

VIASURE *Leishmania* 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
Leishmania spp.	FAM	*18S rRNA* gene
Extraction control (EC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A3. 2. Target, channel and genes.

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

A3.2 Reagents provided

VIASURE *Leishmania* 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).

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Echevés
Responsable

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-LEI101LE, VS-LEI101HE, VS-LEI106LE, VS-LEI106HE, VS-LEI112LE and VS-LEI112HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-LEI113LE and VS-LEI113HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-LEI101E, VS-LEI136E and VS-LEI172E. 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).

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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) by 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 *Leishmania* Positive Control in an area away from the other components.

A3.3.2 Lyophilized positive control

Leishmania 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 *Leishmania* 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 *Leishmania* 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).

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

If-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

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	95ºC
45	Denaturation	10 sec	95ºC
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60ºC

Table A3. 6. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*18S rRNA* gene) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

ANNEX 4

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-LEI196TE

Table A4. 1. References.

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE *Leishmania* 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
Leishmania spp.	FAM	*18S rRNA* gene
Extraction control (EC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A4. 2. Target, channel and genes.

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

A4.2 Reagents provided

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

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-LEI196TE.

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.

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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 *Leishmania* Positive Control in an area away from the other components.

A4.3.2 Lyophilized positive control

Leishmania 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 *Leishmania* 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 *Leishmania* 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 *Leishmania* 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 *Leishmania* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Presidente

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	95ºC
45	Denaturation	10 sec	95ºC
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60ºC

Table A4. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*18S rRNA* gene) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa de DNA de especies de *Leishmania* en muestras de biopsias de piel, de sangre o de aspirado de médula ósea, procedentes de individuos con sospecha de infección por *Leishmania spp.* (o leishmaniasis), por su profesional de la salud. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de la leishmaniasis visceral (LV) y leishmaniasis cutánea (LC) en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de los especímenes clínicos y posteriormente amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar diferentes especies de *Leishmania.*

2. Introducción y explicación

La leishmaniasis es una enfermedad de transmisión vectorial causada por un protozoo parasitario de la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*, género *Leishmania*. Este parásito puede infectar tanto a humanos como a otros animales tras la picadura de un flebótomo hembra portador, un mosquito (conocido comúnmente como mosca de la arena) de 2-3 mm de longitud. Aunque la enfermedad suele manifestarse de manera asintomática tras la inoculación del parásito por parte del vector, más de 20 especies de *Leishmania* pueden dar lugar al desarrollo de leishmaniasis, de la cual se distinguen tres formas principales: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis visceral (LV) y leishmaniasis mucocutánea (LMC). LC es la variedad más común de leishmaniasis en todo el mundo, y consiste en el desarrollo de úlceras que van desde lesiones pequeñas y localizadas a úlceras más extensas por todo el cuerpo. Puede ocurrir que broten muchas lesiones, responsables de la aparición de cicatrices desfigurantes y/o incapacitantes. Los parásitos *Leishmania* que causan LC se distinguen comúnmente entre las especies del Viejo Mundo (como *L. major, L. tropica,* y *L. aethiopica*, que son prevalentes en la Cuenca del Mediterráneo, el Medio Este, el Cuerno de África o el Subcontinente Indio) y del Nuevo Mundo (como *L. amazonensis, L. mexicana, L. braziliensis,* y *L. guyanensis*, endémicas en América Central y del Sur). Estos parásitos se clasifican en uno de dos subgéneros, *Leishmania* o *Vianna*, según el lugar de desarrollo y su adhesión al intestino del vector. LMC, a menudo considerada como una forma de LC, es una afección potencialmente mortal y altamente desfigurante debido a la destrucción tardía de la mucosa y cartílago oronasofaríngeo, afectando ocasionalmente a la laringe, y provocando el desarrollo de neumonía por aspiración. El 1-10% de los casos de LMC se deben a la infección por el subgénero *Vianna* (*L. braziliensis* y *L. panamensis*, y en ocasiones, *L. guyanensis* y *L. amazonensis*). LV conlleva ataques irregulares de fiebre, pérdida significativa de peso, inflamación del bazo e hígado y anemia severa. Esta forma de leishmaniasis es causada por *L. donovani* en Asia y África, mientras que en la Cuenca del Mediterráneo, el Medio Este, Asia central, América del Sur y Central se asocia a la infección por *L. infantum*. La tasa de mortalidad asociada a esta forma de la enfermedad puede llegar a ser del 100% tras 2 años si no es tratada.

La leishmaniasis se ha extendido históricamente por climas tropicales a través de múltiples territorios. Es endémica en Asia, el Medio Este, Norte de África, el Mediterráneo y el Sur y Centro de América, localizándose en 89 países. Se dan entre 1,5 a 2 millones de casos nuevos al año en todo el mundo, y 70.000 muertes anuales son atribuidas a esta enfermedad. Acorde con la OMS, la mayoría de nuevos casos de LV comunicados mundialmente en el 2018 se dieron en Brasil, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía, India y Kenia, mientras que los nuevos casos de LC

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

comunicados también mundialmente en el 2018 se localizaron principalmente en Brasil, Bolivia, Perú, Colombia, Argelia, Túnez, Irak, Siria, Irán, Turkmenistán y Afganistán.

El diagnóstico de la leishmaniasis se ha realizado tradicionalmente mediante la combinación de métodos de diagnóstico directos e indirectos. Los métodos "gold-standard" del diagnóstico de leishmaniasis hasta la fecha han sido la examinación histopatológica mediante microscopía de tejidos fijados, o cultivos *in vitro* para detectar al parásito en estadío amastigote. Sin embargo, la sensibilidad de la observación directa es dependiente de las condiciones en las que se encuentre el tejido, haciendo necesaria la utilización de técnicas alternativas. Existen varios ensayos serológicos disponibles, entre los que se incluyen la prueba de aglutinación directa, el ELISA, la inmunofluorescencia o el western blot, pero requieren interpretarse en el contexto del historial clínico. Los métodos moleculares basados en la amplificación de DNA nuclear o quinetoplástico son muy sensibles y permiten la identificación de las especies de *Leishmania*. Estos tests son especialmente importantes cuando las técnicas más sencillas fallan (ej: sobre las lesiones de mucosa donde los parásitos son esporádicos, o en lesiones crónicas). Las plataformas de PCR tienen valores de sensibilidad de entre el 92 y el 100%. Algunas dianas seleccionadas para el desarrollo de ensayos PCR han sido la Proteína de Choque por Calor de 70 kDa (Heat Shock Protein 70 kDa (HSP70)), el espaciador transcrito interno 1 (Internal transcibed spacer 1 (ITS-1)), o la subunidad pequeña del ribosoma 18S. La región del rRNA del 18S (18S rRNA), que es parte de la subunidad pequeña del ribosoma eucariótico, es comúnmente utilizado para el diagnóstico de diferentes especies de *Leishmania*, lo que refleja su naturaleza altamente conservada.

3. Procedimiento

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección cualitativa de DNA de *Leishmania spp.* en muestras de biopsia de piel, de sangre y aspirados de médula ósea. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Leishmania spp.* se lleva a cabo mediante la amplificación de una región conservada del gen *18S rRNA* de *Leishmania spp.*, utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia.

VIASURE *Leishmania* 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 *Leishmania* 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** con el que monitorizar la inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes 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 productos con control de extracción y el anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA E. OLIVERA
DIRECTOR TECNICO

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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).
- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o ≤ –70°C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 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).

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Roche Molecular Diagnostics LightCycler ® 480, Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Linear NEOS-96 Real Time PCR System, Bioer Technology QuantGene 9600, Applied Biosystems QuantStudio®6 instrument y Qiagen Rotor-Gene® Q. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506). Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los tests 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.

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

- 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 *Leishmania* 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-LEI113L, VS-LEI113H, VS-LEI136, VS-LEI172, VS-LEI113LE, VS-LEI113HE, VS-LEI136E y VS-LEI172E). 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-LEI136, VS-LEI172, VS-LEI136E y VS-LEI172E (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.

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO
BIOARS S.A.
Presidente

- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Leishmania* 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 productos 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 productos con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection kit ha sido testado en muestras de biopsia de piel, muestras de sangre y aspirados de médula ósea. Otros tipos de muestras diferentes deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras clínicas se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba.

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA LORENA
DIRECTOR TECNICO
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Echevés

Las muestras deben transportarse a las siguientes condiciones de temperatura recomendadas por la CDC, siguiendo las regulaciones locales y nacionales para el transporte de material patogénico:

- Biopsias de piel: en medio estéril a temperatura ambiente <48h o entre 2-8ºC > 48h, y en recipiente estéril entre 2-8ºC durante <24 h.
- Muestras de sangre y aspirados de médula ósea: a temperatura ambiente <2 h o a -80 ° C > 2 h.

Para un transporte de duración prolongada (más de 2 horas), se recomienda el envío a -20 ° C o menos.

Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8ºC hasta 2 horas o pueden congelarse a -20ºC o idealmente a -80ºC para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben ser 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/parasites/leishmaniasis/resources/pdf/Leishmaniasis_Guide_Submission_2021.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), García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)* y Bruschi, F., & Gradoni, L. (Eds.). (2018). The leishmaniases: old neglected tropical diseases. *Springer*.

8.2. Extracción de DNA

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

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

- MagDEA Dx SV kit, utilizando el equipo magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).
- EZ1 DNA tissue kit utilizando el equipo EZ1 Advanced automated instrument (QIAGEN).
- EZ1 DNA blood kit utilizando el equipo the EZ1 Advanced automated instrument (QIAGEN).
- High Pure PCR purification kit para muestras de tejido (Roche Diagnostics).
- Speedtools DNA Extraction kit (Biotools).

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

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.

El uso de controles positivo y negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para *Leishmania spp.* en el pocillo de control positivo. Para la prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	*Leishmania spp.* (FAM)[1]	Control Interno (HEX)[2]	Interpretación de Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	**Válido**
Control Negativo (CN)	≥40 o no señal	≤40	**Válido**

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles. Ct valores. no señal = sin curva de amplificación.

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

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

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

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

Leishmania spp. (FAM)	Control Interno (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes
≤40	≤40 o no señal [1]	**DNA de *Leishmania spp.* Detectado**
≥40 o no señal	≤ 35 [2]	**DNA de *Leishmania spp.* no Detectado [2]**
≥40 o no señal	≥ 35 o no señal [2]	**Test Fallido – Repita el Test [2]**

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

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

2 En el caso de que el gen diana de *Leishmania spp.* resulte negativo, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct ≥ 35 del control interno, el resultado se considera "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.

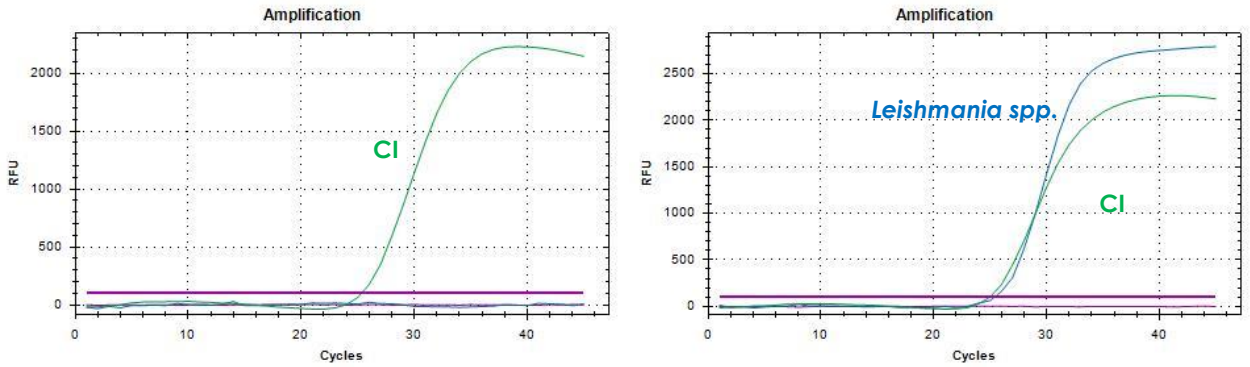
IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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.

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



Control Negativo **Control Positivo**

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.

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

Controles	*Leishmania spp.* (FAM)[1]	Control de Extracción (HEX)[2]	Interpretación de Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	**Válido**
Control Negativo (CN)	≥40 o no señal	≤40	**Válido**

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Ct valores. sin señal = no curva de amplificación.

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

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

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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

Leishmania spp. (FAM)	Control de Extracción (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes
≤40	≤40 o no señal [1]	**DNA de *Leishmania spp.* Detectado**
≥40 o no señal	≤ 35 [2]	**DNA de *Leishmania spp.* no Detectado [2]**
≥40 o no señal	≥ 35 o no señal [2]	**Test Fallido – Repita el Test [2]**

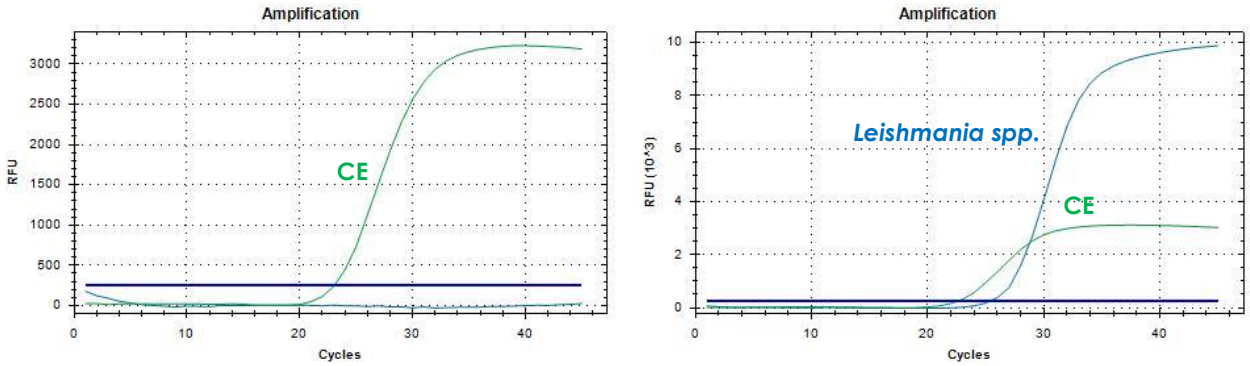
Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores. no señal = sin curva de amplificación.

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

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

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

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



Control Negativo **Control Positivo**

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras de biopsias de piel, de sangre y de aspirados de médula ósea.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

- 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 *Leishmania spp.,* ya sea por el gran número de copias de molde DNA que contiene cada vial *Leishmania* Positive Control, muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Leishmania* 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 deben llevarse a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Las combinaciones de cebadores y sondas específicas para la detección del gen *18S rRNA* empleadas en el test VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit, diseñado para la detección de *Leishmania spp.,* no mostraron homologías combinadas significativas con el genoma humano o microflora humana, que pudiera originar falsos positivos predecibles.
- 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 durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
    - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de *Leishmania spp*.
    - Una carga protozoaria 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 cualquier tipo de fármaco utilizado para prevenir la leishmaniasis 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 protozoos viables y no implica que estos protozoos sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias protozoarias diana (gen *18S rRNA*).
- Resultados negativos no excluyen padecer leishmaniasis 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 protozoaria durante las infecciones causadas por *Leishmania spp*. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el protozoo.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades de transmisión vectorial son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por *Leishmania spp.*, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

- 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.
- El análisis *in silico* de los primers y sonda mostró que VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit detecta las siguientes especies de la subfamilia *Leishmaniinae,* sin relevancia clínica para el diagnóstico de la leishmaniasis:

Número de secuencias analizadas	**983** *L. aethopica* *L. amazonensis* *L. braziliensis* *L. chagasi* *L. donovani* *L. gerbilli* *L. guyanensis* *L. infantum* *L. major* *L. mexicana* *L. panamensis* *L. tropica* *L. turanica*
Max Fw mismatches	0
Max Rv mismatches	0
Max sonda mismatches	0
Especies detectadas sin mismatches	*Crithidia expoeki* *Crithidia bombi* *Crithidia brevicula* *Crithidia mellificae*
Especies detectadas con mismatches	*Lotmaria passim*

Tabla 5. Análisis *in silico* de primers y sonda diseñados para la detección de *Leishmania spp*.

11. Control de calidad

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

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y especificidad clínica de VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Kit fue evaluada empleando muestras clínicas (de biopsias de piel y muestras viscerales) procedentes de pacientes con sospecha de padecimiento de leishmaniasis, realizando diferentes evaluaciones multicéntricas en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado:

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

	Lugar	Tipo muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	Certest Biotec e Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Madrid, España)	Todos los tipos de muestras clínicas	Speedtools DNA Extraction kit (Biotools) + Applied Biosystems 2720 thermal cycler + DNA Technologies DTlite Real-Time PCR System + Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	*Leishmania spp.*
1.A		Muestras de biopsia de piel		
1.B		Muestras de sangre periférica		
1.C		Muestras de aspirados de médula ósea		
2	'Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau' y Universidad de Barcelona, (Barcelona, España)	Todos los tipos de muestras clínicas	EZ1 DNA tissue kit y EZ1 DNA blood kit (QIAGEN) empleando el equipo EZ1 Advanced automated instrument + High Pure PCR purification kit para muestras de tejido (Roche Diagnosis) + Applied Biosystems QuantStudio®6 instrument	*Leishmania spp.*
2.A		Muestras de biopsia de piel		
2.B		Muestras viscerales		

Tabla 6. Resumen de los centros, tipos de muestra y flujo de trabajo llevado a cabo durante las evaluaciones clínicas.

Los valores positivo y negativo, falso positivo y negativo, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	Nested-PCR: Ln-PCR según Cruz et al.2002[1], 2006[2]	*Leishmania spp.*	88	79	0	0	1 (0,95-1)	1 (0,95-1)	1 (0,95-1)	1 (0,95-1)
1.A			35	26	0	0	1 (0,90-1)	1(0,86-1)	1 (0,90-1)	1 (0,86-1)
1.B			26	26	0	0	1 (0,86-1)	0,96 (0,86-1)	1 (0,86-1)	0,96 (0,86-1)
1.C			27	27	0	0	1 (0,87-1)	1 (0,87-1)	1 (0,87-1)	1 (0,87-1)
2	Algoritmo de referencia*	*Leishmania spp.*	27	21	1	0	1 (0.87 – 1)	0.95 (0.77 – 0.99)	0.96 (0.79 – 0.99)	1 (0.80 – 1)
	Leishmania spp. Real-TM PCR kit (Sacace biotechnologies)		28	16	0	5	0.84 (0.63 – 0.94)	1 (0.79 – 1)	1 (0.84 – 1)	0.76 (0.52 – 0.90)
2.A	Algoritmo de referencia*		23	20	1	0	1 (0,85-1)	0,95 (0,76-0,99)	0,95 (0,76-0,99)	1 (0,79-1)
	Leishmania spp. Real-TM PCR kit (Sacace biotechnologies)		24	16	0	4	0,85 (0,67 – 0,96)	1 (0,79 – 1)	1 (0,82 – 1)	0,80 (0,55-0,93)
2.B	Algoritmo de referencia*		4	1	0	0	1 (0.39 – 1)	1 (0.02 – 1)	1 (0.39 – 1)	1 (0.02 – 1)
	Leishmania spp. Real-TM PCR kit (Sacace biotechnologies)		4	0	0	1	0.8 (0.28-0.99)	n.a.#	1 (0.47-1)	n.a.#

Tabla 7. Valores positivo y negativo verdaderos, valores positivo y negativo falsos, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit.
 # Debido la falta de valores negativos verdaderos, no pudo calcularse la especificidad clínica del test.

*** Algoritmo de referencia: Microscopía campo claro + cultivo de muestra empleando el medio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) y el medio Schneider Drosophyla + In-house real-time PCR según Mary et al. 2004[3] con modificaciones según Martín-Esguerra et al. 2020[4] y Vélez et al. 2020[5].**

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

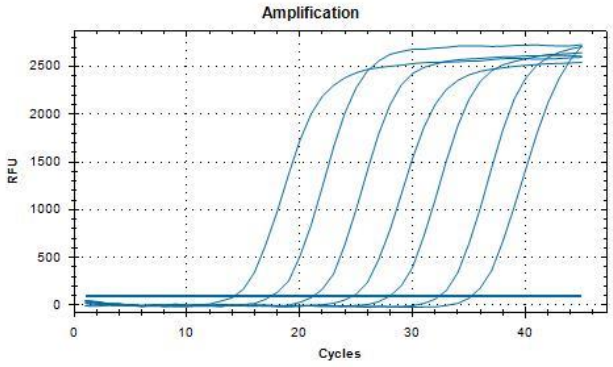
1 Cruz, I., Canavate, C., Rubio, J.M., Morales, M.A., Chicharro, C., Laguna, F., Jimenez-Mejias, M., Sirera, G., Videla, S., Alvar, J., Spanish HIV-Leishmania Study Group. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring Leishmania infantum infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *96*, S1/185-S1/189.
2 Cruz, I., Chicharro, C., Nieto, J., Bailo, B., Cañavate, C., Figueras, M.C., Alvar, J. (2006) Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol, 44*(7), 2343-7.
3 Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., et al. (2004) Quantification of Leishmania infantum DNA by a rea-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clinic Microbiol, 42*, 5249-55. doi: 10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004.
4 Martín-Ezquerra, G., Fisa, R., Riera, C., Rocamora, V., Fernández-Casado, A., Barranco, C., Serra, T., Baró, T., Pujol, R.M. (2009) Role of Leishmania spp. infestation in nondiagnostic cutaneous granulomatous lesions: Report of a series of patients from a Western Mediterranean area. *British Journal of Dermatology 161*, 320–325. doi: 0.1111/j.1365-2133.2009.09282.x.
5 Velez, R., Domenech, E., Rodríguez-Cortés, A., Barrios, D., Tebar, S., Fernández-Arévalo, A., Aguilar, R., Dobaño, C., Alberola, J., Cairó, J., Gállego, M. (2020). Evaluation of canine leishmaniosis vaccine CaniLeish® under field conditions in native dog populations from an endemic Mediterranean area – a randomized controlled trial. *Acta Tro*, doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105387.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar *Leishmania spp.* utilizando VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de 10 copias genómicas por reacción para *Leishmania spp.* (gen *18S rRNA*) con una tasa de positividad del 95%, en muestras sanguíneas.

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



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Leishmania spp.* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos asociados a enfermedades transmitidas por vía sanguínea. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

Prueba de reactividad cruzada					
Anaplasma marginale	-	Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Virus Encefalitis St Louis	-
Bartonella henselae cepa *Houston-1*	-	Virus Chikungunya F24	-	*Theileria annulata*	-
Borrelia hermsii	-	*Coxiella burnetii* cepa *Nine Mile Q*	-	Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas cepa Neudorfl	-
Borrelia lusitianae	-	Virus Dengue serotipo 1 cepa Hawaii	-	*Treponema phagedenis*	-
Borrelia valaisiana	-	Virus Dengue serotipo 2 cepa New Guinea C	-	*Trypanosoma cruzi*	-
Borrelia azfelii cepa *P-Ko/1984*	-	Virus Dengue serotipo 3 cepa H87	-	Virus del Nilo Occidental cepa NY99	-
Borrelia bavariensis	-	Virus Dengue serotipo 4 cepa H241	-	Virus del Nilo Occidental cepa Heja	-
Borrelia bisetti	-	Virus Encefalitis Japonesa	-	Virus del Nilo Occidental cepa Ug37	-
Borrelia burgdorferi cepa *IRS*	-	Virus Encefalitis Japonesa cepa Nakayama	-	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D	-
Borrelia burgdorferi sensu stricto cepa *B31*	-	*Leptospira*	-	Virus de la Fiebre Amarilla cepa Neurotrópica Francesa	-
Borrelia garinii cepa *Tipo*	-	*Plasmodium falciparum* cepa *3D7*	-	Virus Zika FB-GWUH-2016	-
Borrelia japonica	-	*Rickettsia conorii* cepa *Moroccan*	-	Virus Zika cepa Africana	-
Borrelia miyamotoi	-	Virus Fiebre Rift Valley cepa AR21229	-	Virus Zika cepa Asiática PF13/251013-18	-
Borrelia spielmanii	-	Virus Fiebre Rift Valley cepa MP12	-	Virus Zika cepa Polinesia Francesa cepa 11468/16	-

Tabla 8. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a DNA sintético y DNA extraído de muestras clínicas infectadas por diferentes especies de *Leishmania*: *L. infantum, L. major, L.mexicana, L. tropica,* y subgénero *L. Viannia* (*L. braziliensis* y *L. panamensis*), mostrando un resultado positivo.

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

ANEXO 1

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-LEI106L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-LEI106H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-LEI112L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-LEI112H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-LEI113L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-LEI113H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI136
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI172
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-LEI101L
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-LEI101H
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI101

Tabla A1. 1.Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE *Leishmania* 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
Leishmania spp.	FAM	gen *18S rRNA*
Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

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

A1.2 Reactivos suministrados

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

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA A. MARENI
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LEI101L, VS-LEI101H, VS-LEI106L, VS-LEI106H, VS-LEI112L y VS-LEI112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LEI113L y VS-LEI113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Leishmania 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LEI101, VS-LEI136 y VS-LEI172. 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).

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1Control positivo liofilizado

El vial de *Leishmania* 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 *Leishmania* 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 -20ºC 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 *Leishmania* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

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

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

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

Tabla A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *18S rRNA*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-LEI196T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE *Leishmania* 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
Leishmania spp.	FAM	gen *18S rRNA*
Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

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

A2.2 Reactivos suministrados

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

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LEI196T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Leishmania* 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 *Leishmania* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco)

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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 *Leishmania* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Leishmania* 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	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *18S rRNA*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). (Para comprobar los canales de detección más comunes,

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

ANEXO 3

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-LEI106LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-LEI106HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-LEI112LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-LEI112HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-LEI113LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-LEI113HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI136E
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI172E
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-LEI101LE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-LEI101HE
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-LEI101E

Tabla A3. 1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

VIASURE *Leishmania* 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
Leishmania spp.	FAM	gen *18S rRNA*
Control de Extracción (CE)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A3. 2. Diana, canal y genes.

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

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Leishmania* 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).

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Gutierrez
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Leishmania 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
Leishmania Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A3. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LEI101LE, VS-LEI101HE, VS-LEI106LE, VS-LEI106HE, VS-LEI112LE y VS-LEI112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Leishmania 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
Leishmania Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A3. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LEI113LE y VS-LEI113HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Leishmania 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
Leishmania Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3. 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LEI101E, VS-LEI136E y VS-LEI172E. 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).

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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 -20ºC 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 *Leishmania* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Leishmania* 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 *Leishmania* 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 -20ºC 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 *Leishmania* 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®).

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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

Tabla A3. 6. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *18S rRNA*) y HEX, JOE o VIC (Control Extracción). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-LEI196TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE *Leishmania* 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 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
Leishmania spp.	FAM	gen *18S rRNA*
Control de Extracción (CE)	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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Leishmania 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
Leishmania 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 *Leishmania* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LEI196TE.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOG. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

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 *Leishmania* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Leishmania* 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 *Leishmania* 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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

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

Hoja Adicional de Firmas
Informe firma conjunta
Número: IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

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 *Leishmania* 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	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95ºC
45	Desnaturalización	10 seg	95ºC
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60ºC

Tabla A4. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *18S rRNA*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Bibliography/Bibliografía

1. Bruschi, F., & Gradoni, L. (2018). The leishmaniases: Old neglected tropical diseases. In *The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0
2. Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, *392*(10151), 951–970. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2
3. Conter, C. C., Mota, C. A., dos Santos, B. A., de Souza Braga, L., de Souza Terron, M., Navasconi, T. R., Fernandes, A. C. B. S., Demarchi, I. G., de Castro, K. R. R., Aristides, S. M. A., Lonardoni, M. V. C., Teixeira, J. J. V., & Silveira, T. G. V. (2019). PCR primers designed for new world Leishmania: A systematic review. *Experimental Parasitology*, *207*, 107773. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107773
4. Gállego, M., & Riera, C. (n.d.). *LAS LEISHMANIOSIS HUMANAS: LEISHMANIOSIS AUTÓCTONA POR Leishmania infantum*.
5. León, C. M., Muñoz, M., Hernández, C., Ayala, M. S., Flórez, C., Teherán, A., Cubides, J. R., & Ramírez, J. D. (2017). Analytical performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six Leishmania species DNA in Colombia. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1907. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01907
6. Maxfield, L., & Crane, J. S. (2020). Leishmaniasis. In *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/
7. Moreira, O. C., Yadon, Z. E., & Cupolillo, E. (2017). The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. *Acta Tropica*. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.020
8. Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, *10*(82), 1–10. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5
9. World Health Organization. (2021). *Leishmaniasis*. https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1

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

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
DIRECTOR TECNICO

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	24/06/2021

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

Revision: 24th June 2021

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

F-566 rev01

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes and/or variations on the texts and pictures shown.

República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Año de la Grandeza Argentina

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número: IF-2026-90341698-APN-INPM#ANMAT

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Miércoles 16 de Septiembre de 2026

Referencia: Rótulo y manual de instrucciones 77060

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 73 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2026.09.16 14:49:07 -03:00

Lorena Terrizzano
Director Nacional
Instituto Nacional de Productos Médicos
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2026.09.16 14:49:08 -03:00