

Vitassay qPCR

MTB complex

PCR en tiempo real para la detección cualitativa e identificación de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species in respiratory samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR MTB complex permite la detección cualitativa e identificación de DNA de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones causadas por especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, junto con los datos clínicos del paciente, los factores de riesgo epidemiológico, y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR MTB complex 4x8-well strip, low profile	7041071
Vitassay qPCR MTB complex 4x8-well strip, high profile	7042071

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S071/ 7042S071	MTB complex strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C071	MTB complex Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o ≤ -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex

- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Mycobacterium es un género de patógenos que infectan animales y humanos, siendo el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) el más conocido. *Mycobacterium tuberculosis* es un pequeño bacilo aeróbico, no móvil, y también un patógeno humano obligado. Está estrechamente relacionado con siete especies de micobacterias (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. mungi*), que juntas forman el complejo *M. tuberculosis* (MTBC).

M. tuberculosis es el agente causante de la tuberculosis (TB), que fue declarada emergencia mundial por la OMS en 1994. La tuberculosis es una enfermedad infecciosa transmitida por el aire que sigue provocando más de 10 millones de nuevos casos y más de 1,5 millones de muertes en todo el mundo cada año. El órgano más comúnmente afectado son los pulmones, pero también puede dañar el sistema nervioso central, el sistema linfático y el sistema circulatorio. Su diagnóstico podría ser difícil porque *M. tuberculosis* puede afectar a cualquier órgano, lo que suele llevar a un retraso en el diagnóstico. *M. tuberculosis* es un agente infeccioso que nace en el aire, y un paciente con tuberculosis transmitirá la bacteria a través de las gotas de esputo y los núcleos de dichas gotas. Cuando una persona sana inhala estas gotitas, *M. tuberculosis* llega a sus alvéolos respiratorios, donde establece un foco de infección. En los niños o en los individuos inmunodeprimidos, la tuberculosis puede manifestar sus síntomas clínicos poco tiempo después de la infección (3 a 4 semanas), mientras que la mayoría de los pacientes (sanos) desarrollan una infección tuberculosa latente, que podría llegar a reactivarse dos años después de la primera infección. Los pacientes con VIH tienen un riesgo muy alto de reactivación, al igual que otras condiciones inmunosupresoras como la diabetes mellitus. Algunos de los síntomas de la tuberculosis son tos persistente (productiva), hemoptisis, sudoración nocturna, pérdida de peso, fiebre, fatiga anormal, inflamación de los ganglios linfáticos y dolor torácico o abdominal.

La inusual composición estructural y química de la pared celular de las micobacterias obstruye la entrada de medicamentos y complica el tratamiento. Para limitar la resistencia a los antibióticos de la bacteria, la tuberculosis latente suele tratarse con un solo antibiótico, mientras que la tuberculosis activa se trata mejor con una combinación de diferentes antibióticos. En las últimas décadas, la OMS ha estudiado diferentes medidas de control de la tuberculosis, la más destacada es el tratamiento directamente observado con quimioterapia de corta duración (DOTS), establecido en 1995.

El cultivo de micobacterias es el estándar de oro para el diagnóstico de la tuberculosis, pero generalmente no es accesible a todo el mundo debido a sus requisitos técnicos y

de bioseguridad. En los últimos años, se han desarrollado pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos para regiones específicas de *M. tuberculosis*, como la PCR convencional y la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), entre otras. Estos métodos moleculares, precisos y rápidos, permiten detectar *M. tuberculosis* en muestras clínicas.

Principio del test

Vitassay qPCR MTB complex se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de las secuencias de inserción *IS6110* e *IS1081*. Tras la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de los patógenos se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5' - 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR MTB complex, se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Tras la reacción de amplificación, el complejo *M. tuberculosis* se detecta en el canal FAM, y el Control Interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.

- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- 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.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR MTB complex ha sido testado en muestras respiratorias (esputo). El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras respiratorias deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medio de transporte (según el tipo de muestra), etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras deben transportarse a temperatura ambiente como máximo durante 2 horas o a 4°C hasta 24 horas. Para un transporte de mayor duración (más de 24 horas), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse a 4°C hasta 24 horas o pueden congelarse a -20°C o menos (-80°C idealmente) para un tiempo prolongado. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- Miller JM, et al. (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. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Specimen collection guidelines. (CDC). Disponible en: <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>

Extracción de DNA

Realizar el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras respiratorias utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular).

MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)

* En las muestras de esputo, la cantidad recomendada es de aproximadamente 200 µl que se pueden pipetear. En estas muestras para la mejora del rendimiento y la calidad del ADN bacteriano, es recomendable su pretratamiento con N-acetil-l-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH). Tras la descontaminación, se deben resuspender los sedimentos celulares en un volumen final máximo de 1 ml de tampón fosfato. Además, el uso de pequeños volúmenes de elución (50-100 µl) puede aumentar la concentración de ADN.

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del MTB complex Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo para cada uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (complejo *M. tuberculosis*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el threshold se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de threshold

puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de threshold para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación (Ct ≤40) en el canal FAM.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct >40 o no señal) en el canal FAM.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del control positivo y control negativo.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

MTB complex		Interpretación
Complejo <i>M. tuberculosis</i> (FAM)	Control Interno (HEX)	
+	+/- ¹	DNA de especies del complejo <i>M. tuberculosis</i> detectado
-	+ ²	DNA molde diana no Detectado ²
-	- ²	Test fallido ²

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

¹ 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. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

² En el caso de que la detección de las regiones diana de los patógenos resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct >35 del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el

ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada).

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

El rendimiento clínico del Vitassay qPCR MTB complex se evaluó en primer lugar en una evaluación retrospectiva utilizando restos en diferentes matrices (extractos de ADN de cultivos bacterianos, muestras respiratorias, orina y muestras de heces). Éstas se recogieron previamente de pacientes con manifestaciones clínicas compatibles con la infección tuberculosis. Tras la caracterización inicial, 75 muestras resultaron positivas a *M. tuberculosis* y 69 fueron negativas utilizando los métodos tradicionales considerados como gold standard. Los restos de los ácidos nucleicos correspondientes a estas muestras se analizaron con el kit Vitassay, que informó de 74 resultados positivos verdaderos, 1 falso negativo, 1 falso positivo y 68 negativos verdaderos.

Además, se evaluó la especificidad en un estudio prospectivo utilizando 327 restos de muestras clínicas respiratorias (esputo, aspirado bronquial y lavado broncoalveolar). Estas muestras se recogieron con signos y síntomas compatibles con una infección respiratoria y se caracterizaron exhaustivamente como positivas para bacterias y hongos respiratorios de diversas familias. Sólo dos muestras resultaron positivas tanto en el ensayo Vitassay como en los métodos de cultivo, mostrando una especificidad del 100%.

Los valores medios de sensibilidad y especificidad clínica de este kit son de 0,98 (0,92-1) y 0,99 (0,98-1).

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción para las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 (tasa positividad $\geq 95\%$).

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección del complejo *M. tuberculosis* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies:

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175)	-	<i>Mycobacterium gordonae</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium kansasii</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) (clade 3C2a.1)	-	<i>Mycobacterium marinum</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	-	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A y C	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
Virus Respiratorio Sincitial (VRS) tipo A y B	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Rinovirus humano	-
Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Legionella micdadei</i>	-	Coronavirus humano 229E, OC43 y NL63	-
Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Metapneumovirus humano A y B	-
Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	Parainfluenza virus humano 1, 2, 3 y 4	-
Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B	-	<i>Legionella longbeache</i>	-	Bocavirus humano	-
Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	Adenovirus humano 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-	Coronavirus MERS	-

Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Mycobacterium abscessus</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Virus Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2)	-	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR MTB complex para las especies del complejo *M. tuberculosis* se evaluó utilizando DNA extraído de las siguientes cepas, mostrando resultados positivos:

Mycobacterium bovis AF 2122/97

Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Mycobacterium tuberculosis TMC 331

Mycobacterium tuberculosis X004439

M. tuberculosis L2 sublinaje Beijing

M. tuberculosis L4 sublinajes Euro-Americanos

M. tuberculosis T

M. tuberculosis Haarlem

M. tuberculosis LAM

M. tuberculosis X

Mycobacterium africanum (L5 y L6)

Mycobacterium microti

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR MTB complex ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

¹: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de muestras respiratorias (esputo). El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el MTB complex positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido el aislamiento de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) mutaciones potenciales de las secuencias diana de especies del complejo *M. tuberculosis* identificadas por este test que pueden provocar que el DNA sea indetectable e) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; f) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del DNA puede no indicar la presencia de bacterias viables y/o infecciosas o que sean el agente causante de los síntomas clínicos.
- Resultados negativos no impiden la infección por especies del complejo *M. tuberculosis* y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en

diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar las bacterias.

- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con especies del complejo *M. tuberculosis*, y se han descartado otras enfermedades respiratorias, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.

Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler® 480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Formatos especiales ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena
qTOWER
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition"
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III. Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Intended use

Vitassay qPCR MTB complex allows the qualitative detection and identification of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* complex species in respiratory samples. This product is intended to aid in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* complex species infections, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR MTB complex 4x8-well strip, low profile	7041071
Vitassay qPCR MTB complex 4x8-well strip, high profile	7042071

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S071/ 7042S071	MTB complex strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C071	MTB complex Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex

- Micropipettes (1-20 μL , 20-200 μL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Mycobacterium is a genus of animal and human pathogens, with *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) the most well-known. *Mycobacterium tuberculosis* is a small aerobic, non-motile bacillus, and an obligate human pathogen. It is very closely related to seven mycobacterial species (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* and *M. mungi*), that together form the *M. tuberculosis* complex.

M. tuberculosis is the causative agent of tuberculosis (TB), which was declared global emergency in 1994 by WHO. TB is an airborne infectious illness which continues to result in over 10 million new cases and more than 1.5 million deaths worldwide each year. The lungs are the most commonly affected organ, but it can also damage the central nervous system, lymphatic system and circulatory system. Its diagnostic could be difficult because *M. tuberculosis* can affect any organ, which often leads to delayed diagnosis. *M. tuberculosis* is an air-born infectious agent, and a patient with active TB will spread the bacterium by sputum droplets and droplet nuclei. When a healthy person inhales these droplets, *M. tuberculosis* reaches the respiratory alveoli, where it establishes an infection focus. In children or immunosuppressed individuals, clinically manifest TB may develop shortly (3 to 4 weeks) after infection, whereas most patients (healthy ones) develop a latent TB infection, which could reach in reactivation two years after primary infection. HIV patients are at very high risk of reactivation, as well as other immunosuppressive conditions such as diabetes mellitus. Some of the TB symptoms are persistent (productive) cough, hemoptysis, night sweats, weight loss, fever, abnormal fatigue, lymph node swelling and thoracic or abdominal pain.

The unusual structural and chemical composition of the mycobacterium cell wall obstructs medication entrance and complicates treatment. To limit the potential antibiotic resistance of the bacterium, latent TB is normally treated with a single antibiotic whereas active TB disease is best treated using combination of different antibiotics. Over the past few decades, the WHO has advocated several different TB control measures, the most prominent of which is directly observed treatment with short-course chemotherapy (DOTS), established in 1995.

Mycobacterial culture is the gold standard for TB diagnosis, however not generally accessible due to technical and biosafety requirements. In recent years, nucleic acid amplification-based tests for *M. tuberculosis* specific regions have been developed, such as conventional PCR, and quantitative real-time PCR (qPCR), among others. Those accurate and rapid molecular methods, allow *M. tuberculosis* to be detected in clinical samples.

Principle of the test

Vitassay qPCR MTB complex is based on the real-time amplification of a conserved region of the insertion sequences *IS6110* and *IS1081*. After DNA isolation, the pathogens presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR MTB complex is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. After the amplification reaction, *M. tuberculosis* complex is detected in FAM channel, and the Internal Control (IC) is detected in HEX, VIC, or JOE channels (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.

- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR MTB complex has been tested in respiratory samples (sputum). Other sample types should be validated by the user.

Overall, respiratory samples should be collected appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be transported at room temperature for up to 2 hours or at 4°C for up to 24 hours. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. The samples can be stored at 4°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or lower (at -80°C ideally) for a long time. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- Miller JM, et al. (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. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en

Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

- Specimen collection guidelines. (CDC). Available at: <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>

DNA extraction

For nucleic acid isolation from respiratory samples, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek Molecular)

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

* For sputum samples, the recommended amount of sputum is approximately 200 µl that can be pipetted. To improve the yield and quality of bacterial DNA from sputum specimens, it is recommended a sample pre-treatment with N-acetyl-l-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH). After decontamination, the cell pellets should be resuspended in a maximum final volume of 1 mL of phosphate buffer. In addition, usage of small elution volumes (50-100 µL) may raise the DNA concentration.

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized MTB complex Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.

- Pipette 5 µL of DNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*M. tuberculosis* complex), and HEX, JOE, or VIC (Internal Control). Depending on the equipment used select the proper detection channel (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

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

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve (Ct ≤40) in FAM channel, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence (Ct >40 or no signal) in FAM channel, which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in positive control and negative control wells.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

MTB complex		Interpretation
<i>M. tuberculosis</i> complex (FAM)	Internal Control (HEX)	
+	+/- ¹	DNA of <i>M. tuberculosis</i> complex species detected
-	+ ²	Targets not detected ²
-	- ²	Test failure ²

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

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

² In the case of negative pathogens target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is a signal' absence or Ct value >35 of Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The Vitassay qPCR MTB complex clinical performance was firstly assessed in a retrospective evaluation using leftovers in different matrices (DNA extracts from bacterial culture, respiratory specimens, urine, and stool samples). These were previously collected from patients with clinical manifestations compatible with tuberculosis infection. After the initial characterisation, 75 positive samples were positive *M. tuberculosis* and 69 were negative using traditional methods considered as gold standard. Leftovers of the nucleic acids corresponding to these samples were analysed with Vitassay kit, which reported 74 true positive results, 1 false negative, 1 false positive and 68 true negative.

In addition, specificity was assessed in a prospective study using 327 remnants from clinical respiratory samples (sputum, BAS, and BAL). These samples were collected with signs and symptoms compatible with respiratory infection and were thoroughly characterised positive for respiratory bacteria and fungi of diverse families. Only two samples were found to be positive in both, Vitassay assay and culture methods showing a specificity of 100%.

Mean clinical sensitivity and specificity values for this kit is 0.98 (0.92-1) and 0.99 (0.98-1).

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. This assay has a detection limit of 10 DNA copies per reaction for insertion sequences IS6110 and IS1081 (positive rate $\geq 95\%$).

Analytical specificity

The analytical specificity for the *Mycobacterium tuberculosis* complex detection, was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed with any of the species:

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

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR MTB complex kit's reactivity for *Mycobacterium tuberculosis* complex species was evaluated against extracted DNA from the following strains, showing positive results:

Mycobacterium bovis AF 2122/97

Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Mycobacterium tuberculosis TMC 331

Mycobacterium tuberculosis X004439

M. tuberculosis L2 sublinaje Beijing

M. tuberculosis L4 sublinajes Euro-Americanos

M. tuberculosis T

M. tuberculosis Haarlem

M. tuberculosis LAM

M. tuberculosis X

Mycobacterium africanum (L5 y L6)

Mycobacterium microti

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR MTB complex has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

¹: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from respiratory samples (sputum). The use of other samples has not been established.
- The correct test performance depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- 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 either by MTB complex Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including DNA isolation); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) potential mutations of the target regions of the *M. tuberculosis* complex species covered by this test which may result in DNA being undetectable e) pathogen load below the limit of detection for the assay; f) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- Detection of DNA may not indicate the presence of viable and/or infectious bacteria or that these are the causative agents for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude *M. tuberculosis* complex species infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimal specimen types and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the bacteria.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible *M. tuberculosis* complex species infection, and other respiratory illnesses have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.

- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.

Attached I. Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler @480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler @96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclers	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) See Attached III to configure exposure settings.

Attached II. Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range must be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III. Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

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










Bibliography/Bibliografía

- Bansal, R., Sharma, D., & Singh, R. (2018). Tuberculosis and its Treatment: An Overview. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(1), 58–71.
- Lyu, L., Li, Z., Pan, L., Jia, H., Sun, Q., Liu, Q., & Zhang, Z. (2020). Evaluation of digital PCR assay in detection of M.tuberculosis IS6110 and IS1081 in tuberculosis patients plasma. *BMC infectious diseases*, 20(1), 657.
- Mashabela, G. T., de Wet, T. J., & Warner, D. F. (2019). *Mycobacterium tuberculosis* Metabolism. *Microbiology spectrum*, 7(4), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0067-2019.
- Natarajan, A., Beena, P. M., Devnikar, A. V., & Mali, S. (2020). A systemic review on tuberculosis. *The Indian journal of tuberculosis*, 67(3), 295–311.
- Seki, M., Choi, H., Kim, K., Whang, J., Sung, J., & Mitarai, S. (2021). Tuberculosis: A persistent unpleasant neighbour of humans. *Journal of infection and public health*, 14(4), 508–513.
- Suárez, I., Fünfer, S. M., Kröger, S., Rademacher, J., Fätkenheuer, G., & Rybniker, J. (2019). The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Deutsches Arzteblatt international*, 116(43), 729–735.

Trademarks

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

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
			Número de referencia Catalogue number



VA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com