

# Vitassay qPCR

## MTBC/NTM

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de MTBC/NTM en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection of MTBC/NTM in human samples



## Uso previsto

Vitassay qPCR MTBC/NTM, permite la detección del complejo *M. tuberculosis* (MTBC), del género mycobacterium, y de la especie *M. tuberculosis* mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones producidas por el complejo *M. tuberculosis* (MTBC), del género mycobacterium, y de la especie *M. tuberculosis*.

## Referencias

Vitassay qPCR MTBC/NTM 4x8-well strip, low profile	7041048
Vitassay qPCR MTBC/NTM 4x8-well strip, high profile	7042048

## Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S048/ 7042S048	MTBC/NTM strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C048	MTBC/NTM 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

- 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  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

Las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* constituyen un importante problema de salud pública debido a la amplia resistencia a los antibióticos en algunas cepas. Las micobacterias se subdividen en tres grupos: el complejo *Mycobacterium tuberculosis* que produce tuberculosis, las micobacterias no tuberculosas llamadas NTM o MOTT (Mycobacterias distintas de la tuberculosis) que pueden causar un amplio espectro de enfermedades y *Micobacterium leprae* que produce la lepra. La diferenciación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de NTM es de gran importancia para el control de infecciones y la elección de la terapia antimicrobiana.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad respiratoria crónica infecciosa causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Las bacterias generalmente atacan los pulmones (tuberculosis pulmonar), pero las bacterias de la tuberculosis también pueden atacar cualquier otra parte del cuerpo, como el riñón, la columna vertebral y el cerebro. La enfermedad de tuberculosis en los pulmones o la garganta puede ser infecciosa. Esto significa que las bacterias se pueden propagar a otras personas. La tuberculosis en otras partes del cuerpo, como el riñón o la columna vertebral, generalmente no es infecciosa.

Las bacterias de la tuberculosis se propagan por el aire de una persona a otra. Cuando una persona con enfermedad de tuberculosis de los pulmones o la garganta tose, estornuda, escupe, habla o canta, impulsa los gérmenes de la tuberculosis al aire. Las personas cercanas pueden inhalar los gérmenes de la tuberculosis e infectarse. Una vez en el cuerpo, las bacterias pueden asentarse en los pulmones y comenzar a crecer. Desde allí, pueden moverse a través de la sangre a otras partes del cuerpo, como el riñón, la columna vertebral y el cerebro. Las personas con enfermedad de tuberculosis son más propensas a contagiarla a las personas con las que pasan tiempo todos los días. Esto incluye a familiares, amigos y compañeros de trabajo o de escuela.

No todas las personas infectadas con la bacteria de la tuberculosis se enferman. Las bacterias de la tuberculosis pueden vivir en el cuerpo sin causar la enfermedad. Esto se denomina infección de tuberculosis latente. Las personas con infección de tuberculosis

latente no tienen síntomas, no se sienten enfermas y no pueden propagar las bacterias de la tuberculosis a otras personas. En la mayoría de las personas infectadas, el cuerpo puede combatir las bacterias para evitar que crezcan. Por tanto, existen dos afecciones relacionadas con la tuberculosis: la infección de tuberculosis latente (LTBI) y la enfermedad de tuberculosis.

La tuberculosis afecta principalmente a los adultos en sus años más productivos. Sin embargo, todos los grupos de edad se encuentran en riesgo. Según el informe de la OMS, casi un tercio de la población mundial ha sido infectada por *M. tuberculosis*. Sin embargo, sólo el 10% de las personas infectadas desarrollan un estado de enfermedad activo con la aparición de síntomas clínicos, lo que sugiere que el sistema inmunitario puede controlar la infección y prevenir la enfermedad activa en la mayoría de la población. Las personas con tuberculosis activa pueden infectar de 5 a 15 personas a través del contacto cercano en el transcurso de un año. Aproximadamente una cuarta parte de la población mundial tiene tuberculosis latente.

Para las personas cuyos sistemas inmunitarios son débiles, especialmente aquellas con infección por VIH, el riesgo de desarrollar la enfermedad de tuberculosis es mucho mayor que para las personas con sistemas inmunitarios normales. Sin el tratamiento adecuado, el 45% de las personas VIH-negativas con tuberculosis en promedio y casi todas las personas VIH-positivas con tuberculosis morirán. El riesgo de tuberculosis activa también es mayor en las personas que sufren de otras afecciones que afectan al sistema inmunitario como la desnutrición.

Los síntomas de la enfermedad de tuberculosis dependen de dónde crecen las bacterias de la tuberculosis en el cuerpo. Los síntomas comunes de la enfermedad de tuberculosis incluyen debilidad o fatiga, escalofríos, falta de apetito, pérdida de peso, fiebre y sudores nocturnos. La enfermedad de tuberculosis en los pulmones puede causar síntomas como dolor en el pecho, tos prolongada y tos con sangre o esputo. Los síntomas de la enfermedad de tuberculosis en otras partes del cuerpo dependen de la zona afectada.

La identificación temprana, rápida y precisa de *M. tuberculosis* y la determinación de la susceptibilidad a los medicamentos es esencial para el tratamiento y manejo de esta enfermedad.

### **Principio del test**

Vitassay qPCR MTBC/NTM se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región del 16S rRNA para el género mycobacterium, mediante la amplificación de las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 para el complejo *M. tuberculosis* y mediante la amplificación de un fragmento de la región TbD1 para la especie de *M. tuberculosis*. Tras la extracción de DNA, la presencia del complejo *M. tuberculosis* (MTBC), del género mycobacterium, y de la especie *M. tuberculosis* se detecta

mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR MTBC/NTM, se trata de un test listo 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. Dos regiones de las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 son detectadas en el canal FAM, un fragmento del 16S rRNA en el canal ROX y un fragmento de la región TbD1 se amplifica en el canal Cy5, mientras que 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*.
- 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.
- 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.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

## Procedimiento

### Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

GenoLyse® (Hain Lifescience GmbH).

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

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, utilizando COBAS® AmpliPrep (Roche).

Puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático para la extracción de DNA a partir de cultivo de micobacterias, cepas de micobacterias aisladas de muestras clínicas y muestras de esputo de pacientes con baciloscopia positiva o negativa. Para mejorar el rendimiento y la calidad del DNA bacteriano extraído a partir de las muestras de esputo, se recomienda un pretratamiento de la muestra con N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH). Después de la descontaminación, los sedimentos celulares se deben resuspender en un volumen final máximo de 1 ml de tampón fosfato. Además, el uso de pequeños volúmenes de elución (50-100 µL) puede aumentar la concentración de DNA.

### **Preparación del control positivo**

Reconstituir el contenido liofilizado del MTBC/NTM 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).
- 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) y 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
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (\*) a través del canal FAM (Secuencias de inserción IS6110 e IS1081), ROX (16S rRNA), Cy5 (región TbD1) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

### Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

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 en los canales FAM, ROX y Cy5.

#### Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal en FAM, ROX y Cy5.

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

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:

Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 (FAM)	16S rRNA (ROX)	Region TbD1 (Cy5)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+ *	+	+/-	-	+	<i>M. tuberculosis</i> Positiva o <i>M. tuberculosis</i> y NTM Positivas (Ct en canal ROX < Ct en canales FAM y/o Cy5)
+	- #	+	+/-	-	+	<i>M. tuberculosis</i> Positiva
+	- #	- #	+/-	-	+	Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva
+	+ *	-	+/-	-	+	Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Ct en canal FAM < Ct en canal ROX) o Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> y NTM Positivas (Ct en canal ROX < Ct en canal FAM)
-	+ †	-	+/-	-	+	NTM Positiva
-	-	-	+	-	+	MTBC y NTM negativa
-	-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	+	Inválido

**Positivo (+):** Señal de amplificación

**Negativo (-):** No hay señal de amplificación

†: Debido a NTM ambiental, las curvas de amplificación con Ct tardío pueden aparecer en el canal ROX.

\*: Una muestra se considera NTM positiva si el valor de Ct obtenido en el canal ROX (16S rRNA) es menor que los valores de Ct obtenidos en los canales FAM (secuencias de inserción IS6110 e IS1081) y/o Cy5 (región TbD1). Debido a la contaminación cruzada y/o contaminación ambiental las curvas de amplificación con Ct tardío pueden aparecer en los canales FAM y/o Cy5.



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

Si las muestras negativas para todos los parásitos no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

## **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**

Vitassay qPCR MTBC/NTM se evaluó con DNA extraído de 52 cepas clínicas (12 cepas de NTM, 13 cepas del MTBC, 25 cepas de *M. tuberculosis* de diferentes linajes y sublinajes, y 2 muestras con cepas mixtas). Vitassay qPCR MTBC/NTM detectó 12 muestras NTM positivas, 13 muestras MTBC positivas y 24 muestras *M. Tuberculosis* positivas. Estos resultados se compararon con los obtenidos con los métodos de referencia en el diagnóstico de tuberculosis activa (cultivo).

Además, Vitassay qPCR MTBC/NTM también se evaluó con 130 muestras de esputo descontaminadas (49 de pacientes con infección respiratoria bacteriana, 30 de pacientes con infección respiratoria por NTM y 51 de pacientes con infección tuberculosa). Estos resultados se compararon con los obtenidos con los métodos de referencia en el diagnóstico de tuberculosis activa (cultivo). En pacientes con infección respiratoria por NTM, la identificación de las especies de NTM se realizó con INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2 (Fujirebio). En pacientes con diagnóstico de TB, el MTBC se identificó con SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid test (Abbot). Vitassay qPCR MTBC/NTM detectó 23 muestras NTM positivas y 50 muestras MTBC/*M. Tuberculosis* positivas.

Estos resultados indicaron la alta sensibilidad y especificidad del kit de diagnóstico molecular Vitassay qPCR MTBC/NTM.

## Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes patógenos ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción.

## Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de MTBC/NTM fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos.

No se observaron reacciones cruzadas de MTBC/NTM entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Mycobacterium celatum</i>	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Mycobacterium chimaera-intracellulare</i>	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)
<i>Chlamydia caviae</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Mycobacterium genavense</i>	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A y C	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	Virus Influenza B/Florida/04/06
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Mycobacterium microti</i>	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>

<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	Adenovirus humano 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 31, 40 y 41
<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Bocavirus humano
<i>Mycobacterium africanum</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> TMC 331	Coronavirus humano 229E, OC43 y NL63
<i>Mycobacterium africanum</i> linajes L5 y L6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> X004439	Metapneumovirus humano A y B
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> linajes 1, 2, 3, y 4 (T sublinaje, LAM sublinaje, and X sublinaje)	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4
<i>Mycobacterium avium</i> complex (MAC)	<i>Mycobacterium xenopi</i>	Rhinovirus humano
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MERS Coronavirus
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Virus respiratorio sincitial (RSV)
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG		

### Reactividad analítica

Vitassay qPCR MTBC/NTM Real Time PCR para la especie *M. tuberculosis* ha sido evaluado frente a las cepas *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331 y *Mycobacterium tuberculosis* X004439, y diversas cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a los linajes 1, 2, 3, y 4 (sublinaje T, sublinaje LAM, y sublinaje X), obteniéndose un resultado positivo.

Vitassay qPCR MTBC/NTM Real Time PCR para el género *mycobacterium* ha sido evaluado frente a cepas *Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, diversas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* perteneciente a los linajes 1, 2, 3, y 4 (sublinaje T, sublinaje LAM, y sublinaje X),, *Mycobacterium africanum*, diversas cepas de *Mycobacterium africanum* pertenecientes a los linajes L5 y L6, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium chelonae* complex (group III- *M. abscessus*), *Mycobacterium chimaera-intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium peregrinum*,

*Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum*, y *Mycobacterium xenopi*, obteniéndose un resultado positivo.

Vitassay qPCR MTBC/NTM Real Time PCR para el complejo de *M. tuberculosis* ha sido evaluado frente a las cepas *Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, diversas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* pertenecientes a los linajes 1, 2, 3, y 4 (sublinaje T, sublinaje LAM, y sublinaje X),, *Mycobacterium africanum*, diversas cepas de *Mycobacterium africanum* pertenecientes a los linajes L5 y L6, y *Mycobacterium microti*, obteniéndose un resultado positivo.

### **Termocicladores compatibles**

Vitassay qPCR MTBC/NTM, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: 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**

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por el complejo *M. tuberculosis* (MTBC), género *mycobacterium*, y de la especie *M. tuberculosis*. 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 probado en DNA extraído de cultivo de micobacterias, cepas de micobacterias aisladas de muestras clínicas y muestras de esputo de pacientes con baciloscopia positiva o negativa. Para evitar la contaminación cruzada, utilice diluciones de una suspensión de cultivo y/o cepas clínicas. 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

humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.

- 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 falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes patógenos, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

## 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
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
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™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Roche</b>
LightCycler® 480 Real-Time PCR System
LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
<b>Analytik Jena Biometra</b>
TOptical
qTOWER 2.0
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

\* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

## Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

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
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene® Q Qiagen</b>	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	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	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
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000



## Intended use

Vitassay qPCR MTBC/NTM allows the detection and differentiation of the *M. tuberculosis* complex (MTBC), the genus mycobacterium, and the specie *M. tuberculosis* by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of the *M. tuberculosis* complex (MTBC), the genus mycobacterium, and the specie *M. tuberculosis* infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

## References

Vitassay qPCR MTBC/NTM 4x8-well strip, low profile	7041048
Vitassay qPCR MTBC/NTM 4x8-well strip, high profile	7042048

## Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Quantity
7041S048/ 7042S048	MTBC/NTM strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C048	MTBC/NTM 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 in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order 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

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

## Summary

*Mycobacterium tuberculosis* infections constitute a major public health problem due to extensive antibiotic resistance in some strains. Mycobacteria are subdivided into three groups: The *Mycobacterium tuberculosis* complex that produces tuberculosis, the non-tuberculous mycobacteria called NTM or MOTT (Mycobacteria Other Than Tuberculosis) that can cause a broad spectrum of diseases and *Mycobacterium leprae* that produces leprosy. The differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from NTM is of primary importance for infection control and choice of antimicrobial therapy.

Tuberculosis (TB) is an infectious chronic respiratory disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). The bacteria usually attack the lungs (pulmonary TB), but TB bacteria can also attack any part of the body such as the kidney, spine, and brain. TB disease in the lungs or throat can be infectious. This means that the bacteria can be spread to other people. TB in other parts of the body, such as the kidney or spine, is usually not infectious.

TB bacteria are spread through the air from one person to another. When a person with TB disease of the lungs or throat coughs, sneezes, spits, speaks, or sings, they propel the TB germs into the air. People nearby may breathe in the TB germs and become infected. Once in the body, the bacteria can settle in the lungs and begin to grow. From there, they can move through the blood to other parts of the body, such as the kidney, spine, and brain. People with TB disease are most likely to spread it to people they spend time with every day. This includes family members, friends, and coworkers or schoolmates.

Not everyone infected with TB bacteria becomes sick. TB bacteria can live in the body without making you sick. This is called latent TB infection. People with latent TB infection have no symptoms, do not feel sick and cannot spread TB bacteria to others. In most people who breathe in TB bacteria and become infected, the body can fight the bacteria to stop them from growing. As a result, two TB-related conditions exist: latent TB infection (LTBI) and TB disease.

Tuberculosis mostly affects adults in their most productive years. However, all age groups are at risk. According to the WHO report, almost one third of the worldwide population has been infected by *M. tuberculosis*. However, only 10% of infected individuals develop an active disease state with the appearance of clinical symptoms, suggesting that the immune system can control the infection and prevent active disease in most of the population. People with active TB can infect 5–15 other people through close contact over the course of a year. About one-quarter of the world's population has latent TB.

For people, whose immune systems are weak, especially those with HIV infection, the risk of developing TB disease is much higher than for people with normal immune systems. Without proper treatment, 45% of HIV-negative people with TB on average and nearly all HIV-positive people with TB will die. The risk of active TB is also greater in persons suffering from other conditions that impair the immune system like undernutrition.

Symptoms of TB disease depend on where in the body the TB bacteria are growing. Common symptoms of TB disease include weakness or fatigue, chills, lack of appetite, weight loss, fever and night sweats. TB disease in the lungs may cause symptoms such as chest pain, prolonged cough and coughing up blood or sputum. Symptoms of TB disease in other parts of the body depend on the area affected.

Early, rapid and accurate identification of *M. tuberculosis* and the determination of drug susceptibility is essential for the treatment and management of this disease.

### **Principle of the test**

Vitassay qPCR MTBC/NTM test is based on the real-time amplification of a conserved region of the 16S rRNA for the identification of the genus mycobacterium, the amplification of the insertion sequences IS6110 and IS1081 for the identification of *M. tuberculosis* complex and the amplification of a fragment of the TbD1 region for the identification of *M. tuberculosis* specie. After DNA isolation, the presence of the *M. tuberculosis* complex (MTBC), the genus mycobacterium, and the specie *M. tuberculosis* is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR MTBC/NTM test 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 reaction inhibition. The amplification of two regions of the Insertion sequences IS6110 and IS1081 are detected through the FAM channel, a fragment of the 16S rRNA is detected through the ROX channel and a fragment of TbD1 region is detected through the Cy5 channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex II).

## Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- 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 broken or if the foil has been broken or damaged.
- 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.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

## Procedures

### Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using Maxwell® 16 instrument (Promega).

GenoLyse® (Hain Lifescience GmbH).

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

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, using COBAS® AmpliPrep (Roche).

You can use your optimized routine manual or automated system to extract DNA from mycobacterial culture, mycobacterial strains isolated from clinical samples, and sputum samples from patients with positive or negative smear microscopy. To improve the performance and quality of bacterial DNA extracted from sputum samples, pretreatment

of the sample with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) is recommended. After decontamination, the cell pellets must be resuspended in a maximum final volume of 1 ml of phosphate buffer. Furthermore, the use of small elution volumes (50-100  $\mu$ L) can increase the DNA concentration.

### Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized MTBC/NTM Positive Control (red tube) in the 100  $\mu$ L of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order 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.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15  $\mu$ L of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5  $\mu$ L of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- 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
Initial denaturation	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 (Insertion sequences IS6110 and IS1081), ROX (16S rRNA), Cy5 (TbD1 region) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II).

### **Analysis and interpretation of results**

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

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

#### **Positive control**

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM, ROX and Cy5, which validates the reaction.

#### **Negative control**

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX and Cy5 which validates the reaction.

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

The result interpretation is summarized in the following table:

Insertion sequences IS6110 and IS1081 (FAM)	16S rRNA (ROX)	TbD1 region (Cy5)	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+ *	+	+/-	-	+	<i>M. tuberculosis</i> specie Positive or <i>M. tuberculosis</i> specie and NTM Positives (Ct ROX channel < Ct FAM and/or Cy5 channels)
+	- #	+	+/-	-	+	<i>M. tuberculosis</i> specie Positive
+	- #	- #	+/-	-	+	MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> Positive
+	+ *	-	+/-	-	+	MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> Positive (Ct FAM channel < Ct ROX channel) or MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> and NTM Positives (Ct ROX channel < Ct FAM channel)
-	+ †	-	+/-	-	+	NTM positive
-	-	-	+	-	+	MTBC and NTM negative
-	-	-	-	-	-	Experiment fail
+	+	+	+	+	+	Experiment fail

**(+) Positive:** Amplification signal

**(-) Negative:** No amplification signal

†: Due to environmental NTM, amplification curves with late Ct may appear in the ROX channel.

\*: A sample is considered NTM positive if the Ct value obtained in the ROX channel (16S rRNA) is less than the Ct values obtained in the FAM channels (insertion sequences IS6110 and IS1081) and / or Cy5 (region TbD1). Due to cross contamination and / or environmental contamination, late Ct amplification curves may appear in FAM and / or Cy5 channels.

#: Due to the amplified targets, the FAM signal is stronger than the ROX or ROX and Cy5 signals. Preferential amplification curve can be observed in this channel and absence in ROX channels or ROX and Cy5. This result also indicates the presence of a different MTBC strain from the *M. tuberculosis* or *M. tuberculosis* species.

If the negative samples do not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

### **Quality Control**

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

### **Performance evaluation**

#### **Clinical sensitivity and specificity**

Vitassay qPCR MTBC/NTM was evaluated with DNA extracted from 52 clinical strains (12 NTM strains, 13 MTBC strains, 25 M. tuberculosis strains of different lineages and sublineages, and 2 samples with mixed strains). Vitassay qPCR MTBC / NTM detected 12 positive NTM samples, 13 positive MTBC samples and 24 positive M. tuberculosis samples. These results were compared with those obtained with the reference methods in the diagnosis of active tuberculosis (culture).

In addition, Vitassay qPCR MTBC / NTM was also evaluated with 130 decontaminated sputum samples (49 from patients with bacterial respiratory infection, 30 from patients with respiratory NTM infection and 51 from patients with tuberculous infection). Vitassay qPCR MTBC / NTM detected 23 positive NTM samples and 50 MTBC / M samples. Positive tuberculosis. These results were compared with those obtained with the reference methods in the diagnosis of active tuberculosis (culture). In patients with respiratory NTM infection, identification of NTM species was performed with INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2 (Fujirebio). In patients diagnosed with TB, MTBC was identified with SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid test (Abbot).

These results indicated the high sensitivity and specificity of the molecular diagnostic kit Vitassay qPCR MTBC/NTM.

#### **Analytical sensitivity**

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of MTBC/NTM templates ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/rxn. This assay has a detection limit of  $\geq 10$  DNA copies per reaction.



## Analytical specificity

The analytical specificity for MTBC/NTM was tested within the panel of different microorganisms.

No cross-reactivity of MTBC/NTM was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Mycobacterium celatum</i>	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Mycobacterium chimaera-intracellulare</i>	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus
<i>Chlamydia caviae</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Mycobacterium genavense</i>	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	Influenza B/Florida/04/06 virus
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Mycobacterium microti</i>	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	Human Adenovirus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 31, 40 and 41
<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Human Bocavirus
<i>Mycobacterium africanum</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> TMC 331	Human coronavirus 229E, OC43 and NL63
<i>Mycobacterium africanum</i> lineage L5 and L6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> X004439	Human metapneumovirus A and B

<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> lineage 1, 2, 3, and 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage)	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
<i>Mycobacterium avium</i> complex (MAC)	<i>Mycobacterium xenopi</i>	Human rhinovirus
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MERS Coronavirus
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Respiratory Syncytial virus (RSV)
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG		

### Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR MTBC/NTM for the specie *M. tuberculosis* was evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331 and *Mycobacterium tuberculosis* X004439 strains, and strains of *M. tuberculosis* lineage 1, 2, 3, and 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage), showing positive results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR MTBC/NTM for the mycobacterium genus was evaluated against the following strains: *Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium tuberculosis* lineage 1, 2, 3, and 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium africanum* lineage L5 and L6, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium chelonae* complex (group III- *M. abscessus*), *Mycobacterium chimaera*-*intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium xenopi*, showing positive results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR MTBC/NTM for MTBC strains was evaluated against the following strains: *Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium tuberculosis* lineage 1, 2, 3, and 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium africanum* lineage L5 and L6, and *Mycobacterium microti*, showing positive results.

## Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR MTBC/NTM has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler® tubes.

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

## Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of the *M. tuberculosis* complex (MTBC), the genus mycobacterium, and the specie *M. tuberculosis* infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with DNA extracted from mycobacterial culture, clinical isolates of mycobacteria and sputum (with positive or negative acid-fast bacilli (AFB) smear). In order to avoid cross-contamination, use dilutions of a culture suspension and/or clinical strains. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different pathogens, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## 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
<b>Agilent Technologies</b>	<b>Abbott</b>
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>	<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
<b>BIONEER</b>	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	<b>Analytik Jena Biometra</b>
<b>Bio-Rad</b>	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	<b>BIONEER</b>
<b>Cepheid</b>	Exicycler™ 96
SmartCycler®	<b>Bio-Rad</b>
<b>Qiagen</b>	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
<b>Roche</b>	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	<b>Cepheid</b>
	SmartCycler®
	<b>DNA-Technology</b>
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	<b>Eppendorf</b>
	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
	<b>Qiagen</b>
	Rotor-Gene® Q
	<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

\* 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:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene® Q Qiagen</b>	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	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
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

## Bibliography/Bibliografía

1. Wenping Gong, Yan Liang, and Xueqiong Wu. (2018). The current status, challenges, and future developments of new tuberculosis vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 14(7): 1697–1716..
2. World Health Organization. Tuberculosis. [https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_2) <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.
3. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/tb/>
4. Emilia Cercenado y Rafael Cantón. (2005). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 9a. Micobacterias.*
5. M M Rahman, M R Rahim, A Khaled, T A Nasir, F Nasrin, M A Hasan. (2017). Molecular Detection and Differentiation of Mycobacterium Tuberculosis Complex and Non-tuberculous Mycobacterium in the Clinical Specimens by Real Time PCR. *Jul;26(3):614-620.*
6. Röltgen K, Pluschke G, Spencer JS, Brennan PJ, Avanzi C. (2020). The immunology of other mycobacteria: *M. ulcerans*, *M. leprae*. *Semin Immunopathol.* Feb 25;1-21.
7. María Cebriá-Mendoza, Rafael Sanjuán, Pilar Domingo-Calap. (2019). Directed Evolution of a Mycobacteriophage. *Antibiotics (Basel).* Apr 25;8(2):46.
8. Diana Machado, Isabel Couto, Miguel Viveiros. (2019). Advances in the Molecular Diagnosis of Tuberculosis: From Probes to Genomes. *Infect Genet Evol.* Aug; 72:93-112.

## Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

## 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
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number





**VVA** Vitassay

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

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)