

Vitassay qPCR

Tick Borne Disease

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación del virus Tick Borne Encephalitis (TBEV), *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chafeensis*, *Ehrlichia muris*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), *Borrelia miyamotoi* y/o *B. hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* y/o *Coxiella burnetii* en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV), *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chafeensis*, *Ehrlichia muris*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), *Borrelia miyamotoi* and/or *B. hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* and/or *Coxiella burnetii* in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Tick Borne Disease, permite la detección y diferenciación de RNA viral o DNA genómico específico para Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV), *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chafeensis*, *Ehrlichia muris*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), *Borrelia miyamotoi* y/o *B. hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* y/o *Coxiella burnetii* en sangre, suero, muestras de tejido y cultivo microbiológico de garrapatas, biopsias cutáneas, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección transmitida por garrapatas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de las enfermedades transmitidas por garrapatas.

Referencias

Vitassay qPCR Tick Borne Disease 12x8-well strip, low profile	7041062
Vitassay qPCR Tick Borne Disease 12x8-well strip, high profile	7042062

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S062A/ 7042S062A	<i>Borrelia</i> , <i>Anaplasma</i> & <i>Coxiella</i> strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S062B/ 7042S062B	<i>Rickettsia</i> , <i>Babesia</i> & <i>Ehrlichia</i> strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S062C/ 7042S062C	TBEV strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C062	Tick Borne Disease 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	-	12 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 RNA/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

Las poblaciones de garrapatas están aumentando, al igual que sus áreas de distribución geográfica, sus hábitats y los patógenos que portan. Las garrapatas pueden transmitir patógenos bacterianos, parasitarios y virales, y a menudo albergan más de uno al mismo tiempo, pudiendo transmitir más de uno al morder. Las enfermedades transmitidas por garrapatas que afectan a los seres humanos incluyen: La enfermedad de Lyme, la fiebre recurrente, la babesiosis, la anaplasmosis, la ehrlichiosis, la fiebre Q, la encefalitis transmitida por garrapatas y la fiebre manchada, entre otras.

***Rickettsia* spp.**

Los miembros del género *Rickettsia* (familia *Rickettsiaceae*; orden *Rickettsiales*) pueden clasificarse en *rickettsias* del grupo de la fiebre manchada (SFG), *rickettsias* del grupo del tifus, el grupo *Rickettsia bellii* y el grupo *Rickettsia canadensis*. La fiebre manchada está ampliamente distribuida por diferentes zonas geográficas, pudiendo transmitirse por diferentes garrapatas como: *Amblyomma variegatum* (África subsahariana), *Hyalomma anatolicum excavatum* e *Ixodes ricinus* (Europa), *Demacentor andersoni* y *Demacentor nitens* (América del Norte y Central), *Carios capensis* (Japón, Asia) y *Amblyomma cajennense* (América del Sur). Algunos de los síntomas de la fiebre manchada son fiebre, dolor de cabeza, malestar general, mialgias, náuseas, sarpullido, vómitos y dolor abdominal.

Anaplasma

Anaplasma phagocytophilum es un patógeno zoonótico transmitido por garrapatas *Ixodes* infectadas. El ciervo de cola blanca y el ratón de patas blancas son sus principales reservorios. *A. phagocytophilum* se distribuye por amplias zonas de Europa y partes de Asia central, cuyo vector principal son las garrapatas *Ixodes ricinus* e *Ixodes persulcatus*. En Norteamérica, se encuentra actualmente en la costa este y en las regiones del medio oeste de Estados Unidos, transmitida por *Ixodes scapularis*, y en la costa del Pacífico, transmitida por *Ixodes pacificus*. Algunos de los síntomas de la anaplasmosis son fiebre alta, escalofríos, malestar general, mialgia generalizada y erupción cutánea, dolor de cabeza intenso y síntomas gastrointestinales y respiratorios.

Borrelia

El género *Borrelia* se divide en el grupo de la enfermedad de Lyme (*B. burgdorferi* sensu lato complex) y las especies de *Borrelia* con fiebre recurrente (*B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parkeri* y *B. miyamotoi*). La espiroqueta *B. burgdorferi* es un patógeno zoonótico transmitido por la picadura de una garrapata *Ixodes* infectada. Es muy invasiva e infecta a más seres humanos en Europa, Asia, Rusia y Norteamérica que cualquier otra bacteria transmitida por garrapatas. Los signos y síntomas habituales de la enfermedad de Lyme son fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, fatiga, dolores musculares y articulares y una o varias erupciones de eritema migratorio. Si los pacientes empeoran, los síntomas serán neurológicos y cardíacos, como parálisis de los nervios craneales o dolor torácico.

B. miyamotoi y *B. hermsii* están genéticamente más relacionadas con el grupo de la fiebre recurrente. Mientras que la espiroqueta *B. hermsii* es transmitida por la garrapata *Ornithodoros hermsi*, la espiroqueta *B. miyamotoi* es transmitida por garrapatas *Ixodes* infectadas. Los síntomas comunes de la fiebre recurrente son similares a los de la anaplasmosis, como fiebre, escalofríos, mialgia, fatiga, artralgia, linfadenopatía y posible erupción de eritema migratorio.

Ehrlichia

Las ehrlichiosis son conocidas como importantes enfermedades emergentes transmitidas por garrapatas en los seres humanos, así como en los animales domésticos, y están causadas por la infección con *Ehrlichia* spp. Las *Ehrlichia* spp. más comunes para infectar a los seres humanos son *E. chaffeensis* y *E. muris*. Estos patógenos son transmitidos por garrapatas *Amblyomma americanum* infectadas, y su principal reservorio es el ciervo de cola blanca. Los síntomas comunes de la ehrlichiosis son similares a los de la anaplasmosis, como fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, malestar general, mialgias y náuseas. Otros síntomas son tos, artralgia o erupción. Las complicaciones graves pueden incluir insuficiencia renal, neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda, trastorno neurológico y coagulación intravascular.

Coxiella

Coxiella burnetii es el agente de la fiebre Q, o "fiebre de la consulta", una zoonosis descrita por primera vez en Australia en 1937. Los principales reservorios de *C. burnetii* son el ganado bovino, ovino y caprino, y la transmisión al ser humano se debe con mayor frecuencia a la inhalación de bacterias aerosolizadas y de orina, heces o leche de animales infectados, así como a la picadura de garrapatas. Las especies de garrapatas que son los vectores más frecuentes de *C. burnetii* pertenecen a los géneros *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* y *Dermacentor*. La presentación de la fiebre Q es extremadamente variable, y la infección puede dar lugar a una enfermedad asintomática, aguda o crónica. Los síntomas leves son similares a los de la gripe, como

fiebre, escalofríos, dolor de cabeza o tos, y en los casos graves los pacientes pueden desarrollar neumonía o hepatitis.

Babesia

La babesiosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Babesia*. En el ser humano, las infecciones más frecuentes son las causadas por *B. microti* y, con menor frecuencia, por *B. divergens*. El vector del patógeno son las garrapatas del género *Ixodes*, y las infecciones se producen por sus picaduras. La enfermedad se manifiesta con malestar general, fatiga y síntomas parecidos a los de la gripe, como fiebre, escalofríos, sudoración y dolores articulares y musculares. Debido a la excesiva lisis eritrocitaria, la babesiosis puede provocar anemia hemolítica, coagulopatía intravascular o trombocitopenia, entre otras.

Virus Tick Borne Encephalitis

El virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), que pertenece al género *Flavivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*, es el agente causante de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), una infección neurológica potencialmente mortal que afecta a los seres humanos en Europa y Asia. La mayoría de las infecciones por TBEV se producen por la picadura de una garrapata, aunque un pequeño número de infecciones se producen por el consumo de leche infectada no pasteurizada. Durante el breve periodo febril inicial puede haber fatiga, dolor de cabeza y dolor en el cuello, los hombros y la parte baja de la espalda, acompañados de fiebre alta y vómitos. Los pacientes pueden pasar a una segunda fase, caracterizada por síntomas agudos del sistema nervioso central con fiebre alta, que puede causar meningitis, encefalitis, mielitis o radiculitis.

Principio del test

Vitassay qPCR Tick Borne Disease se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la secuencia 3'UTR del TBEV, del gen 23S rRNA (*Rickettsia* spp.), el gen *CCT-eta rRNA* (*Babesia microti*), el gen *hsp70* (*Babesia divergens*), el gen *GroEl* (*Ehrlichia chafeensis* y *Ehrlichia muris*), el gen 23S rRNA (*Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia miyamotoi* y *B. hermsii*), el gen *msp2* (*Anaplasma phagocitophilum*) y el gen *IS1111* (*Coxiella burnetii*). El RNA viral extraído se transcribe a cDNA utilizando un *primer* específico mediante un paso de transcripción inversa seguido de la reacción en cadena de la polimerasa. 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 Tick Borne Disease, 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. Cada kit incluye tres tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Borrelia burgdorferi* (s.l.), *Borrelia miyamotoi* y/o *B. hermsii*, *Anaplasma phagocitophilum* y *Coxiella burnetii* (*Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips). Tras la reacción de amplificación, *Borrelia burgdorferi* s.l. y *Borrelia miyamotoi* se detecta en el canal FAM, *Anaplasma phagocitophilum* se detecta en el canal ROX, *Coxiella burnetii* se detecta en el canal Cy5 y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado). La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Rickettsia* spp., *Babesia microti* y/o *Babesia divergens* y *Ehrlichia chafeensis* y/o *Ehrlichia muris* (*Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia* 8-well strips). Tras la reacción de amplificación *Rickettsia* spp se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado), *Babesia microti* y *Babesia divergens* se detectan en el canal ROX y *Ehrlichia chafeensis* y *Ehrlichia muris* se detectan en el canal FAM. La tercera tira contiene la mezcla de reacción monoplex para la detección de TBEV (TBEV 8-well strips). Tras la reacción de amplificación, TBEV se detecta en el canal FAM.

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 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.

- Asegurarse de utilizar un pocillo para la determinación de TBEV, otro pocillo para la determinación de *Rickettsia* spp., *Babesia microti/Babesia divergens* y *Ehrlichia chafeensis/Ehrlichia muris* y otro para la determinación de *Borrelia burgdorferi* s.l./*Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocitophilum* y *Coxiella burnetii*. Preste atención para no mezclarlos durante todo el proceso.
- 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.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de RNA/DNA.

Para el aislamiento, la identificación y la caracterización de los patógenos es fundamental una adecuada recolección y transporte de las muestras clínicas. Los especímenes (garrapatas, sangre, suero, muestras de tejido, biopsia cutánea, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial) deben recolectarse de forma adecuada en una zona limpia y procesarse a la mayor brevedad posible, para evitar la pérdida de viabilidad de los agentes etiológicos y permitir el crecimiento adecuado en el cultivo microbiológico, y/o para evitar la degradación de los ácidos nucleicos, y para garantizar la calidad de la prueba.

Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, estas deben ser congeladas a -20°C. En este caso, para poder utilizar las muestras en la prueba deben descongelarse totalmente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los ciclos de congelación y descongelación antes del aislamiento de los ácidos nucleicos deben ser evitados. Se recomienda el uso de muestras frescas o que hayan sido inmediatamente congeladas.

Debido a que las espiroquetas de *B. burgdorferi* están presentes en un número muy bajo en los tejidos o fluidos infectados de los pacientes, para obtener resultados de PCR fiables y consistentes es fundamental un adecuado procedimiento de recolección y transporte de las muestras, y preparación del DNA a partir de muestras clínicas.

Las muestras de sangre pueden ser recolectadas usando un sistema Vacutainer® (con EDTA como estabilizador) y almacenarse posteriormente a 4°C durante una semana. Tras la centrifugación de una muestra de sangre se pueden obtener diferentes componentes sanguíneos (suero y plasma), tras lo cual deben ser almacenados a 4°C durante una semana o a -20°C indefinidamente. El posterior aislamiento de ácidos

nucleicos a partir de sangre completa, suero o plasma se puede llevar a cabo utilizando un volumen de 100 µL y/o siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las muestras de tejido se deben recoger en un recipiente limpio y ser almacenadas inmediatamente a -20°C o -80°C hasta su uso.

Las garrapatas se pueden recolectar directamente de los pacientes usando un método mecánico (fórceps). Para el crecimiento bacteriano, se agrupan los diferentes tejidos diseccionados de cada garrapata y se inicia un cultivo empleando una línea celular primera.

Para las biopsias cutáneas, debe identificarse el borde periférico de la lesión cutánea y en condiciones estériles tomarse una biopsia de 4 mm de diámetro con un punch que recoja estos márgenes periféricos de la lesión. Seguidamente, las muestras deben ser almacenadas inmediatamente a -20°C o -80°C. Para el aislamiento de los microorganismos, cada biopsia cutánea se coloca en un tubo de poliestireno que contenga 6 ml de medio de cultivo sin antibióticos y se incuba a la temperatura adecuada durante el tiempo necesario. En el caso de que el tejido se preserve en medio BSK durante más de 24 horas, algunas espiroquetas podrían haber migrado de la biopsia cutánea al medio de cultivo, entonces el DNA debe prepararse a partir de la biopsia de piel y del medio de cultivo.

El líquido cefalorraquídeo se debe procesar en un laboratorio de microbiología en el plazo de 1 hora tras su recolección. En caso de no ser posible el procesamiento dentro de esa 1 hora, inocular el líquido cefalorraquídeo en medio *Trans-Aislante* (T-I) o similar para su transporte al laboratorio. NO se recomienda su refrigeración. Estas muestras se deben mantener a temperatura ambiente antes de la prueba. Si las muestras se pueden procesar en 1 hora, se recomienda centrifugar el líquido cefalorraquídeo durante 15 minutos a 1000 x g. Posteriormente se toma el sedimento y se siembra en medios primarios. En caso de no ser posible, se recomienda incubar el medio T-I durante la noche.

El líquido sinovial de pacientes con artritis de Lyme se recolecta sin aditivos e inicialmente se puede almacenar a 4°C durante la noche y posteriormente transferirse a -20°C o -80°C hasta su uso.

Tras el cultivo microbiológico de las diferentes muestras (garrapatas, biopsias cutáneas, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial), los ácidos nucleicos se extraerían a partir de 1 ml de cultivo tras su sedimentación por centrifugación (2 minutos a 8000 x g). Para extraer el DNA bacteriano a partir de bacterias Gram positivas, es necesario añadir lisozima de forma adicional.

Con el fin de realizar una recolección, transporte y almacenamiento de muestras más adecuados, se sugiere seguir las recomendaciones del fabricante que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular)

MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Tick Borne Disease Positive Control (tubo rojo) con 300 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 RNA/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
Retrotranscripción	45°C	15 min	1
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 (*) en la primera tira a través de los canales FAM (*Borrelia burgdorferi* (s.l.) y *Borrelia miyamotoi*), HEX, JOE o VIC (Control Interno), ROX (*Anaplasma phagocitophilum*), y Cy5 (*Coxiella burnetii*), en la segunda tira a través de los canales FAM (*Ehrlichia chafeensis* y *Ehrlichia muris*), ROX (*Babesia microti* y *Babesia divergens*) y HEX, JOE o VIC (*Rickettsia* spp.) y en la tercera tira a través del canal FAM (TBEV). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real-Time PCR System 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 del panel de los patógenos.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal en los canales del panel de los patógenos.

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.

Interpretación de resultados para *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips:

- Una muestra se considera positiva para *Borrelia burgdorferi* s.l./*Borrelia miyamotoi* si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal de amplificación*.
- Una muestra se considera positiva para *Anaplasma phagocitophilum* si muestra señal de amplificación en el canal ROX y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal de amplificación*.
- Una muestra se considera positiva para *Coxiella burnetii* si muestra señal de amplificación en el canal Cy5 y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal de amplificación*.

* 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.

- Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.
- En caso de ausencia de señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

Interpretación de resultados para *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia* 8-well strips:

- Una muestra se considera positiva para *Rickettsia* spp. si muestra señal de amplificación en el canal HEX, VIC o JOE y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera positiva para *Babesia microti*/*Babesia divergens* si muestra señal de amplificación en el canal ROX y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera positiva para *Ehrlichia chafeensis*/*Ehrlichia muris* si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera negativa, si la muestra no muestra señal de amplificación en el sistema de detección, pero el control interno del ensayo de *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* es positivo.

Interpretación de resultados para TBEV 8-well strips:

- Una muestra se considera positiva para **TBEV** si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera negativa, si la muestra no muestra señal de amplificación en el sistema de detección, pero el control interno del ensayo de *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* es positivo.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, revisar todos los parámetros, y la forma sigmoidea de la curva. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado.

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 la primera tira. 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

En un estudio se analizaron 95 muestras de DNA extraído de cultivo microbiológicos a partir de garrapatas, biopsia cutánea, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial, con el ensayo *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips utilizando Vitassay qPCR Tick Borne Disease kit. Este estudio incluía un total de 17 cepas de *Borrelia* bien caracterizadas que comprenden 9 genopecies de *Borrelia burgdorferi* sensu lato diferentes. Además, se testaron dos cepas control de la fiebre recurrente, *B. hermsii* and *B. miyamotoi* y espiroquetas que podrían causar reacción cruzada como *Leishmania* spp. y *Treponema* spp. Vitassay qPCR Tick Borne Disease detectó con éxito todas las genopecies de *Borrelia* sensu lato y las cepas del grupo de fiebre recurrente *B. hermsii* y *B. miyamotoi*. No se observó reactividad cruzada con el DNA de las especies de *Leptospira* y *Treponema*.

Vitassay qPCR Tick Borne Disease se evaluó con paneles INSTAND y QCMD de 2017 a 2021. En total se analizaron 186 muestras procedentes de programas QCMD e INSTAND. Vitassay qPCR Tick Borne Disease encontró 40 muestras positivas para *Borrelia* spp., 14 muestras positivas para TBEV y 10 muestras positivas para *Coxiella*.

Los resultados se compararon con los informes finales de los programas EQAs. Todas las muestras fueron detectadas correctamente. Los valores de sensibilidad y especificidad para cada objetivo se muestran en la siguiente tabla:

Diana	OA	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
Borrelia	1 (0.96-1)	40	56	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.93-1)	1 (0.91-1)	1 (0.93-1)
Coxiella	1 (0.96-1)	10	86	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.95-1)	1 (0.69-1)	1 (0.95-1)
TBEV	1 (0.98-1)	14	120	0	0	1 (0.76-1)	1 (0.97-1)	1 (0.76-1)	1 (0.97-1)

OA= Concordancia global, TP = Verdaderos Positivos, TN = Verdaderos Negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor Predictivo Positivo, NPV = Valor Predictivo Negativo.

En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar estos patógenos utilizando Vitassay qPCR Tick Borne Disease.

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 RNA/DNA por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de enfermedades transmitidas por garrapatas fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies, excepto los patógenos diana de cada ensayo:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada			
<i>Anaplasma marginale</i>	-	<i>Borrelia garinii</i>	-/+
<i>Bartonella henselae</i> cepa Houston-1	-	<i>Borrelia japonica</i>	-/+
<i>Borrelia hermsii</i>	-/+	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-/+
<i>Borrelia lusitanae</i>	-/+	<i>Borrelia spielmanii</i>	-/+
<i>Borrelia valaisiana</i>	-/+	<i>Coxiella burnetii</i> cepa Nine Mile Q	-/+
<i>Borrelia azfeli</i> cepa P-Ko/1984	-/+	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-/+	<i>Rickettsia conorii</i> . cepa Moroccan	-/+
<i>Borrelia bisetti</i>	-/+	<i>Leptospira</i>	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto cepa IRS	-/+	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto cepa B31	-/+	<i>Tripanosoma cruzi</i>	-
<i>Japanese encephalitis</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> (cepa 3D7)	-
West Nile Virus (Heja)	-	Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV) cepa Neudorfl	-/+
West Nile Virus (NY99)	-	Zika virus cepa FB-GWUH-2016	-
West Nile Virus (Ug37)	-	Zika Virus (africana cepa)	-
Yellow Fever Virus (17D cepa)	-	Zika Virus (asiática cepa PF13/251013-18)	-
Yellow Fever Virus French Neurotropic	-	Zika Virus cepa 11474/16 (Polinesia Francesa)	-
Chikungunya virus cepa S27 Petersfield	-	Zika Virus cepa 11468/16(Polinesia Francesa)	-
Chikungunya virus Martinique isolate	-	Dengue 1 virus cepa Hawaii	-
Chikungunya virus cepa F24	-	Dengue 2 virus cepa New Guinea C	-
Chikungunya virus WHO IS (R91064)	-	Dengue 3 virus cepa H87	-
St Louis Encephalitis virus	-	Dengue 4 virus cepa H241	-

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Tick Borne Disease se evaluó con las siguientes cepas mostrando un resultado positivo:

TBEV cepa Neurdofl	<i>Borrelia bisettiae</i>
<i>Borrelia garinii</i> (cepas PHei, PWudII, PRef y PLa)	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto (cepas B31, IRS y PBre)
Secuencia sintética de <i>Babesia microti</i>	<i>Rickettsia coronii</i> cepa Moroccan
Secuencia sintética de <i>Babesia divergens</i>	<i>Borrelia garinii</i> cepas OspA Typ3
Secuencia sintética de <i>Ehrlichia chafeensis</i>	<i>B. japonica</i>
Secuencia sintética de <i>Ehrlichia muris</i>	<i>B. lusitaniae</i> (cepa Poti B2)
<i>Borrelia azfeli</i> (cepas P-Ko/1984 y PVPM)	<i>B. spielmanii</i> (cepa PSigII)
<i>Borrelia bavariensis</i> (cepa PBi)	<i>Borrelia valaisiana</i> (cepa VS116)
<i>Borrelia bissettii</i> (cepa PGeb)	<i>B. hermsii</i>
<i>B. miyamotoi</i>	<i>Anaplasma phagocitophylum</i>
<i>Coxiella burnetii</i> cepa Nine Mile Q	

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Tick Borne Disease ha sido probado en los siguientes equipos:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Cobas LightCycler480 System (Roche)
- Step One 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 probado con RNA/DNA extraído de muestras de sangre, suero, tejido y cultivos microbiológicos a partir de garrapatas, biopsia cutánea, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA/DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a resultados falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del RNA/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 con patógenos transmitidos por garrapatas, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA/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
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®4 80II	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
DTlite 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 Tick Borne Disease allows the detection and differentiation of viral RNA or genomic DNA specific for Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV), *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chafeensis*, *Ehrlichia muris*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*s.l.*), *Borrelia miyamotoi* and/or *Borrelia hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* and/or *Coxiella burnetii* in blood, serum, tissue samples and microbiological culture from ticks, biopsy skin, cerebrospinal fluid and synovial fluid from patients with signs and symptoms of Tick Borne diseases. This test is intended for use in the Tick-Borne Disease diagnosis alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Tick Borne Disease 12x8-well strip, low profile	7041062
Vitassay qPCR Tick Borne Disease 12x8-well strip, high profile	7042062

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S062A/ 7042S062A	<i>Borrelia</i> , <i>Anaplasma</i> & <i>Coxiella</i> strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7041S062B/ 7042S062B	<i>Rickettsia</i> , <i>Babesia</i> & <i>Ehrlichia</i> strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7041S062C/ 7042S062C	TBEV strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C062	Tick Borne Disease 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	-	12 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. 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

- RNA/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

Tick populations are increasing, and their geographic ranges are expanding, as the suitable habitats for these arthropod vectors and the pathogens that they carry. Ticks can transmit bacterial, parasitic, and viral pathogens and often harbor more than one agent simultaneously. They also can transmit more than one pathogen when taking a blood meal. Tick Borne Disease affecting humans include Lyme disease, relapsing fever, babesiosis, anaplasmosis, ehrlichiosis, Q fever, Tick Borne encephalitis and spotted fever among others.

***Rickettsia* spp.**

Members of the genus *Rickettsia* (family *Rickettsiaceae*; order *Rickettsiales*) may be classified into spotted fever group (SFG) *rickettsiae*, typhus group *rickettsiae*, the *Rickettsia bellii* group, and the *Rickettsia canadensis* group. Spotted fever is caused by bacteria of the genus *Rickettsia* and is widely distributed by different geographical areas, being able to transmit depending on it by different ticks such as: *Amblyomma variegatum* (Sub-Saharan Africa), *Hyalomma anatolicum excavatum* and *Ixodes ricinus* (Europe), *Demacentor andersoni* and *Demacentor nitens* (North and Central America), *Carios capensis* (Japan, Asia) and *Amblyomma cajennense* (South America). Some of the spotted fever symptoms are fever, headache, malaise, myalgias, nausea, rash, vomiting and abdominal pain.

Anaplasma

Anaplasma phagocytophilum is a zoonotic tick-borne pathogen transmitted by infected *Ixodes* ticks. White-tailed deer and the white-footed mouse are its primary reservoirs. *A. phagocytophilum* is distributed over large portions of Europe and parts of central Asia, where it is vectored by *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks. In North America, is now found on the East Coast and in midwestern regions of the United States, transmitted by *Ixodes scapularis*, and on the Pacific Coast, transmitted by *Ixodes pacificus*. Some of the anaplasmosis symptoms are high fever, chills, malaise,

generalized myalgia and rash, severe headache, and gastrointestinal and respiratory symptoms.

Borrelia

The *Borrelia* genus is divided into the Lyme disease group (*B. burgdorferi* sensu lato complex) and relapsing fever *Borrelia* species (including *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parkeri*, and *B. miyamotoi*). The spirochaete *B. burgdorferi* is a zoonotic tick-borne pathogen transmitted by the bite of an infected *Ixodes* tick. It is highly invasive and infects more humans in Europe, Asia, Russia and North America than any other tick-borne bacteria. Common signs and symptoms of Lyme disease are fever, chills, headache, fatigue, muscle and joint aches and one or more erythema migrans rashes. If patients get worse, the symptoms will be neurological and cardiac such as cranial nerve palsies or chest pain.

B. miyamotoi and *B. hermsii* are genetically more closely related to the relapsing fever group. While spirochete *B. hermsii* is transmitted by its tick vector, *Ornithodoros hermsi*, spirochete *B. miyamotoi* is transmitted by infected *Ixodes* ticks. Relapsing fever common symptoms are similar to anaplasmosis such as fever, chills, myalgia, fatigue, arthralgia, lymphadenopathy and possible erythema migrans rash.

Ehrlichia

Ehrlichioses are known as important emerging tick-borne diseases in humans, as well as in domestic animals, and are caused by infection with *Ehrlichia* spp. The most common *Ehrlichia* spp. to infect humans are *E. chaffeensis* and *E. muris*. These pathogens are transmitted by infected *Amblyomma americanum* ticks, and its major reservoir is the white-tailed deer. Ehrlichiosis common symptoms are similar to anaplasmosis such as fever, headache, chills, malaise, myalgia and nausea. Other symptoms are cough, arthralgia or rash. Severe complications may include renal failure, pneumonia, acute respiratory distress syndrome, neurologic disorder and intravascular coagulation.

Coxiella

Coxiella burnetii is the agent of Q fever, or “query fever,” a zoonosis first described in Australia in 1937. The main reservoirs of *C. burnetii* are cattle, sheep, and goats and transmission to humans is most frequently due to inhalation of aerosolized bacteria and urine, feces or milk of infected animals, and by tick bites. The tick species that are the most frequent vectors of *C. burnetii* belong to the genera *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, and *Dermacentor*. The Q fever presentation is extremely variable, and infection may lead to asymptomatic, acute disease or chronic infection. The mild symptoms are flu-like such as fever, chills, headache or cough, and the severe cases of patients may develop pneumonia or hepatitis.

Babesia

Babesiosis is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Babesia*. In humans, the most prevalent are infections caused by *B. microti* and less frequently *B. divergens*. The pathogen vector is the ticks of the genus *Ixodes*, and the infections occur by tick bites. Disease is manifested by general malaise, fatigue and flu-like symptoms including fever, chills, sweating, joint and muscle pain. Because of the excessive erythrocyte lysis, babesiosis can lead to hemolytic anemia, intravascular coagulopathy, or thrombocytopenia, among others.

Virus Tick Borne Encephalitis

Tick-borne encephalitis virus (TBEV), which is a member of the genus *Flavivirus*, within the family *Flaviviridae*, is the causative agent of tick-borne encephalitis (TBE), a potentially fatal neurological infection affecting humans in Europe and Asia. The majority of TBEV infections occur through a tick bite, although a small number of infections occur through consuming infected unpasteurized milk. During the initial short febrile period can include fatigue, headache and pain in the neck, shoulders, and lower back, accompanied by high fever and vomiting. The patients can progress to a second phase, characterized by acute central nervous system symptoms with a high fever, which can cause meningitis, encephalitis, myelitis or radiculitis.

Test principle

Vitassay qPCR Tick Borne Disease test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the 3'UTR region for TBEV, the 23S rRNA gene for *Rickettsia spp.*, the CCT-eta rRNA for *Babesia microti*, the hsp70 gene for *Babesia divergens*, the GroEI gene for *Ehrlichia chafeensis* and *Ehrlichia muris*, the 23S rRNA gene for *Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia miyamotoi* and *B. hermsii*, the msp2 gene for *Anaplasma phagocitophilum* and the IS1111 gene for *Coxiella burnetii*. The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately in by polymerase chain reaction. After nucleic acids' extraction, the presence of the targets (RNA/DNA) is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon 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 Tick Borne Disease 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 inhibition reaction. Each kit includes three kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *Borrelia burgdorferi* (s.l.), *Borrelia miyamotoi* and/or *B. hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* and *Coxiella burnetii* (*Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips). After the amplification reaction, *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Borrelia miyamotoi* DNA targets are detected in FAM channel, *Anaplasma phagocitophylum* DNA target is detected in ROX channel, *Coxiella burnetii* DNA target is detected in Cy5 channel and the internal control (IC) is detected in HEX, VIC or JOE channels (depending on the equipment used). The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *Rickettsia* spp., *Babesia microti* and/or *Babesia divergens* and *Ehrlichia chafeensis* and/or *Ehrlichia muris* (*Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia* 8-well strips). After the amplification reaction, *Rickettsia* spp. DNA target is detected in HEX, VIC, or JOE channels (depending on the equipment used), *Babesia microti* and *Babesia divergens* are detected in ROX channel and *Ehrlichia chafeensis* and *Ehrlichia muris* are detected in FAM channel. The third strip contains the monoplex reaction mix for the detection of TBEV (TBEV 8-well strips), whose RNA is amplified and detected in FAM channel.

Precautions

- For professional *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 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.
- Make sure to use a well for determining TBEV, another well for determining *Rickettsia* spp., *Babesia microti*/*Babesia divergens* and *Ehrlichia*

chafeensis/Ehrlichia muris and another well for determining *Borrelia burgdorferi* s.l., and *Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocitophilum* and/or *Coxiella burnetii*. Pay attention to not mix them throughout the process.

- 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.

Procedures

Specimen collection, processing and RNA/DNA extraction

For the isolation, identification, and characterization of pathogens, the proper collection and transport of clinical specimens is critical. Specimens (ticks, blood, serum, tissue samples, biopsy skin, cerebrospinal fluid and synovial fluid) should be properly collected in a clean area and be processed as soon as possible to avoid loss of viability of the etiological agents for suitable microbiological culture and/or to prevent nucleic acid degradation, and to guarantee the test quality.

For longer samples' storage, the samples should be frozen at -20°C. In this case, the sample should be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenize sample as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles before isolating nucleic acids should be avoided. It is recommend using fresh samples or immediately frozen.

Given that the *B. burgdorferi* spirochetes number in infected tissues or body fluids of patients is very low, for yielding reliable and consistent PCR results, appropriate procedures for sample collection and transport and DNA preparation from clinical samples are critical.

Blood samples might be collected using vacutainer system (tubes stabilized with EDTA) and be stored at 4°C for up to one week. After blood centrifugation, blood components (serum and plasma) can be obtained and should be stored at 4°C for up to one week or at -20°C indefinitely. Nucleic acids isolation from whole blood, serum or plasma could be performed using 100 µL and/or following the manufacturer's recommendations.

Tissue samples should be collected in a clean container and stored immediately at -20°C or -80°C until use.

Ticks could be collected directly from patients using a mechanical method (forceps). For bacterial growth, tissues from each tick could be pooled and cultivated in primary cell line.

For biopsy skin, the cutaneous lesion peripheral border should be identified and under sterile conditions 4-mm-diameter punch biopsy specimen could be obtained from the lesion peripheral aspect. The specimens should be stored immediately at -20°C or -80°C. For microorganism isolation, each skin biopsy specimen could be placed in a polystyrene tube containing 6 ml of isolation/broth medium without antibiotics and incubated at the corresponding temperature during the corresponding time. If the tissue is kept in BSK medium for over 24h, some spirochetes will have migrated from the skin biopsy to the culture medium. In this case, DNA should be prepared from both the skin biopsy and the medium.

Cerebrospinal fluid specimen should be processed in a microbiology laboratory within 1 hour after collection. If processing within 1 hour is not feasible, cerebrospinal fluid specimen should be inoculated into Trans-Isolate (T-I) medium or similar for transport to the laboratory. Refrigeration is not recommended. These samples should be maintained at room temperature prior testing. If samples can be processed within 1 hour, centrifuge the cerebrospinal fluid specimen for 15 min at 1000 x g. Take the sediment and seed it in primary media. If not feasible, incubate the T-I medium over-night.

Synovial fluids samples from patients with Lyme arthritis could be collected without additives and stored overnight initially at 4°C and then transferred to -20°C or -80°C until use.

After specimen microbiology cultivation (ticks, biopsy skin, cerebrospinal fluid and synovial fluid), nucleic acid could be extracted using 1 mL of the culture after being pelleted by centrifugation (2 min 8000 x g). To perform an extraction of bacterial DNA from gram positive Bacteria the lysozyme addition is needed.

To perform more suitable sample collection, transport, and storage, we suggest following the manufacturer's recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

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:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular)

MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Tick Borne Disease Positive Control (red tube) in 300 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 RNA/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
Reverse transcription	45°C	15 min	1
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 (*) in the first strip through the FAM (*Borrelia burgdorferi* s.l. and *Borrelia miyamotoi*), HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)), ROX (*Anaplasma phagocitophilum*), and Cy5 channels (*Coxiella burnetii*); in the second strip through the FAM (*Ehrlichia chafeensis* and *Ehrlichia muris*), HEX, JOE or VIC (*Rickettsia* spp.), and ROX (*Babesia microti* and *Babesia divergens*) and in the third reaction mix through the FAM (TBEV). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (See 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.

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 in the pathogen panel channels.

Negative control

The negative control included in each run must show the signal absence in the pathogen panel channels.

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

Results' interpretation for *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips:

- A sample is considered positive for *Borrelia burgdorferi* s.l./*Borrelia miyamotoi* if there is an amplification signal in FAM channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal*.
- A sample is considered positive for *Anaplasma phagocitophilum* if there is an amplification signal in ROX channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal.
- A sample is considered positive for *Coxiella burnetii* if there is an amplification signal in Cy5 channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal.

*Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of targets can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

- A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the internal control amplification.
- In case of internal control signal absence in sample wells we recommend repeating the assay by diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible inhibition problems.

Results' interpretation for *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia* 8-well strips:

- A sample is considered positive for *Rickettsia* spp. if there is an amplification signal in HEX, VIC or JOE channel, and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for *Babesia microti/Babesia divergens* if there is an amplification signal in ROX channel, and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for *Ehrlichia chafeensis/Ehrlichia muris* if there is an amplification signal in FAM channel, and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the internal control of *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* assay is positive.

Results' interpretation for TBEV 8-well strips:

- A sample is considered positive for TBEV if there is an amplification signal in FAM channel, and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the internal control of *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* assay is positive.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to review all the parameters, and the sigmoid shape of the curve. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate.

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 the first strip. 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 Tick Borne Disease kit's clinical performance for *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips was tested using 95 DNA samples extracted from microbiological culture from ticks, biopsy skin, cerebrospinal fluid, and synovial fluid. In this study, a total of 17 well characterized *Borrelia* strains comprising 9 different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies were included. Additionally, two relapsing fever control strains *B. hermsii* and *B. miyamotoi* were included as well as the potentially

cross-reactive spirochaetes *Leishmania* spp. and *Treponema* spp. were tested. The Vitassay qPCR Tick Borne Disease successfully detected all tested *Borrelia* sensu lato genospecies and the relapsing fever group strains *B. hermsii* and *B. miyamotoi*. No cross reactivity was observed with DNA from *Leptospira* and *Treponema* species for Vitassay assay.

Vitassay qPCR Tick Borne Disease was evaluated by INSTAND and QCMD panels from 2017 to 2021. A total of 186 samples from QCMD and INSTAND programs were tested. Vitassay qPCR Tick Borne Disease found 40 samples positive for *Borrelia* spp., 14 samples positive for TBEV and 10 samples positive for *Coxiella*. The results were compared with the EQA program final reports. All samples were correctly detected. Sensitivity and specificity values for each target are shown in the following table:

Target	OA	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
Borrelia	1 (0.96-1)	40	56	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.93-1)	1 (0.91-1)	1 (0.93-1)
Coxiella	1 (0.96-1)	10	86	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.95-1)	1 (0.69-1)	1 (0.95-1)
TBEV	1 (0.98-1)	14	120	0	0	1 (0.76-1)	1 (0.97-1)	1 (0.76-1)	1 (0.97-1)

OA= Overall agreement, TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value.

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect those pathogens using Vitassay qPCR Tick Borne Disease.

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 RNA/DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for Tick Borne Disease assay was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was seen between any of the species except the targeted pathogens of each assay:

Cross-reactivity testing			
<i>Anaplasma marginale</i>	-	<i>Borrelia garinii</i>	-/+
<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	<i>Borrelia japonica</i>	-/+
<i>Borrelia hermsii</i>	-/+	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-/+
<i>Borrelia lusitanae</i>	-/+	<i>Borrelia spielmanii</i>	-/+
<i>Borrelia valaisiana</i>	-/+	<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-/+
<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-/+	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-/+	<i>Rickettsia conorii</i> . strain Moroccan	-/+
<i>Borrelia bisetti</i>	-/+	<i>Leptospira</i>	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto strain IRS	-/+	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto strain B31	-/+	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Japanese encephalitis</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> (strain 3D7)	-
West Nile Virus (Heja)	-	Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV) strain Neudorfl	-/+
West Nile Virus (NY99)	-	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-
West Nile Virus (Ug37)	-	Zika Virus (African strain)	-
Yellow Fever Virus (17D strain)	-	Zika Virus (Asiatica strain PF13/251013-18)	-
Yellow Fever Virus French Neurotropic	-	Zika Virus strain 11474/16 (French Polynesia)	-
Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	Zika Virus strain 11468/16(French Polynesia)	-
Chikungunya virus Martinique isolate	-	Dengue 1 virus strain Hawaii	-
Chikungunya virus strain F24	-	Dengue 2 virus strain New Guinea C	-
Chikungunya virus WHO IS (R91064)	-	Dengue 3 virus strain H87	-
St Louis Encephalitis virus	-	Dengue 4 virus strain H241	-

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR Tick Borne Disease kit's analytical reactivity was evaluated against the following strains showing positive results:

TBEV strain Neurdofl	<i>Borrelia bisettiae</i>
<i>Borrelia garinii</i> (strains PHei, PWudII, PRef and PLa)	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto (strains B31, IRS and PBre)
Synthetic sequence of <i>Babesia microti</i>	<i>Rickettsia coronii</i> strain Moroccan
Synthetic sequence of <i>Babesia divergens</i>	<i>Borrelia garinii</i> strains OspA Typ3
Synthetic sequence of <i>Ehrlichia chafeensis</i>	<i>B. japonica</i>
Synthetic sequence of <i>Ehrlichia muris</i>	<i>B. lusitanae</i> (strain Poti B2)
<i>Borrelia azfeli</i> (P-Ko/1984 and PVPM strains)	<i>B. spielmanii</i> (strain PSigII)
<i>Borrelia bavariensis</i> (strain PBi)	<i>Borrelia valaisiana</i> (strain VS116)
<i>Borrelia bissettii</i> (strain PGeb)	<i>B. hermsii</i>
<i>B. miyamotoi</i>	<i>Anaplasma phagocitophylum</i>
<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Tick Borne Disease has been validated on the following equipment:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Cobas LightCycler480 System (Roche)
- Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems)

I: 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 together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with RNA/DNA extracted from blood, serum, tissue samples and microbiological culture from ticks, biopsy skin, cerebrospinal fluid, and synovial fluid. The use of other samples has not been established.
- The test quality depends on the sample's quality; proper RNA/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 might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Tick Borne Disease, either samples containing high concentrations of target RNA/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
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
Excycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Excycler™ 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 Cycler	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽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®48 0II	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 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	

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
DTlite 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

- Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O. et al. (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* Infection: A Paradigm Change. *Clinical Microbiology Reviews*. 30(1):115-190.
- Gayle A and Ringdahl E. (2001). Tick-Borne diseases. *American Family Physician*. 64(3):461-466.
- Guzman N, Yarrarapu SNS and Beidas SO. (2021). *Anaplasma Phagocytophilum*. In: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). PMID: 30020713.
- Johnson DK, Schiffman, EK, Davis JP, et al. (2015). Human Infection with *Ehrlichia muris*-like Pathogen, United States, 2007-2013. *Emerging Infectious Diseases*. 21(10), 1794-1799.
- Kawahara M, Ito T, Suto C, et al. (1999). Comparison of *Ehrlichia muris* Strains Isolated from Wild Mice and Ticks and Serologic Survey of Humans and Animals with *E. muris* as Antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(4):1123-1129.
- Kazar J. (2005). *Coxiella burnetii* Infection. *Annals of the New York Academy of Science*. 1063(1):105-114.
- Madison-Antenucci S, Kramer LD, Gebhardt LL and Kauffman E. (2020). Emerging Tick-Borne Diseases. *Clinical microbiology Reviews*. 33(2):e00083-18.
- Mansfield KL, Johnson N, Phipps, LP, et al. (2009). Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*. 90(8):1781-1794.
- Merhej V and Raoult D. (2011). Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biological Reviews*. 86(2):379-405.
- Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, et al. (2013). Update on Tick-Borne Rickettsioses around the world: a Geographic Approach. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(4):657-702.
- Raoult D, Marrie TJ and Mege JL. (2005). Natural history and pathophysiology of Q fever. *The Lancet Infectious Diseases*. 5(4): 219-226.
- Rożej-Bielicka W, Stypułkowska-Misiurewicz H and Gołąb E. (2015). Human Babesiosis. *Przegl Epidemiol*. 69(3):489-494.
- Schwan, TG, Raffel, SJ, Schrumf ME and Porcella SF. (2007). Diversity and Distribution of *Borrelia hermsii*. *Emerging Infectious Diseases*. 13(3):436-442.
- Wood H and Artsob H. (2012). Spotted Fever Group Rickettsiae: A Brief Review and a Canadian Perspective. *Zoonoses Public Health*. 59(2):65-79.

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