

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 alcuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o \leq -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

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, de las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 para el complejo *M. tuberculosis* y 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.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrolisis 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 MTBC/NTM, 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. 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* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de

pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.

- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR MTBC/NTM ha sido testado en cultivo de micobacterias, aislados clínicos de micobacterias, así como en esputos descontaminados (con baciloscopia positiva o negativa). El usuario debe validar otros tipos de muestras.

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

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

– CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>)

– IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94)

– García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Para las muestras de esputo, la cantidad recomendada es de aproximadamente 200 µl que se pueden pipetear.

Extracción de DNA

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

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

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) o Control positivo reconstituido (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través del canal FAM (Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 - complejo *M. tuberculosis*), ROX (16S rRNA - género mycobacterium), Cy5 (región TbD1 - especie de *M. tuberculosis*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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

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

Se recomienda establecer los valores de threshold para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

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

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación ($Ct \leq 40$) en los canales FAM, ROX y Cy5.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal ($Ct > 40$ o no señal) en FAM, ROX y Cy5.

El control interno (CI) debe mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$) en los pocillos de control positivo y negativo.

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

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

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

Secuencias IS6110 e IS1081 (FAM)	16S rRNA (ROX)	Región TbD1 (Cy5)	Control Interno (HEX)	Interpretación	
+	+	+	+/- ¹	Válido	<p>Especie <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si Ct FAM < Ct ROX) ³</p> <p>o NTM Positiva (Si Ct ROX < Ct FAM y Cy5) ³</p>
+	- #	+	+/- ¹	Válido	<p>Especie <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si Ct FAM > 35) ³</p> <p>Si Ct FAM < 35, repita el ensayo en función del material disponible:</p> <p>a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y testar (ideal), b) volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, c) repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada.</p> <p>Tras repetir la prueba una vez, si el resultado se mantiene, la muestra debe considerarse positiva para Especie <i>M. tuberculosis</i></p>
+	- #	- #	+/- ¹	Válido	<p>Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si Ct FAM > 35) ³</p> <p>Si Ct FAM < 35, repita el ensayo en función del material disponible:</p> <p>a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y testar (ideal), b) volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, c) repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada.</p> <p>Tras repetir la prueba una vez, si el resultado se mantiene, la muestra debe considerarse positiva para Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i></p>

+	+	-	+/- ¹	Válido	Cepa perteneciente al complejo <i>M. tuberculosis</i> diferente a <i>M. tuberculosis</i> Positiva (Si Ct FAM = Ct ROX y/o Si Ct FAM < Ct ROX) ³ o NTM Positivas (Si Ct FAM > Ct ROX) ³
-	+ †	-	+/- ¹	Válido	NTM Positiva (En caso de que aparezcan amplificaciones de Cy5 con un Ct > 37, la muestra debe ser considerada como NTM Positiva)
-	-	-	+ ²	Válido	Dianas no detectadas ²
-	-	-	- ²	Inválido	Test fallido ²

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

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

NTM = non-tuberculous mycobacteria (micobacterias no tuberculosas).

MTBC= *M. tuberculosis* complex (complejo *M. tuberculosis*)

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

#: 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*.

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

² En el caso de que la detección de las regiones diana del género *Mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y de la especie *M. tuberculosis* resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

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

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

Control de Calidad

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

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

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 14 muestras NTM positivas, 15 muestras MTBC positivas y 24 muestras *M. Tuberculosis* positivas. Los resultados obtenidos con Vitassay qPCR MTBC/NTM se compararon con los obtenidos con los métodos de referencia en el diagnóstico de tuberculosis activa (cultivo) y se muestran a continuación:

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP
NTM	14	38	0	0	1 (0.76-1)	1 (0.9-1)
MTBC	15	37	0	0	1(0.78-1)	1(0.9-1)
<i>M. Tuberculosis</i>	24	27	0	1	0.96 (0.79-0.99)	1 (0.87-1)

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). Vitassay qPCR MTBC/NTM detectó 22 muestras NTM positivas, 52

muestras MTBC positivas y 47 muestras *M. Tuberculosis* positivas. Estos resultados se compararon con los obtenidos con el método de referencia que consiste en caracterización con cultivo y la identificación de las especies de NTM con INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2 (Fujirebio) en pacientes con infección respiratoria por NTM, y en pacientes con diagnóstico de TB, el MTBC se identificó con SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid test (Abbott). Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP
NTM	22	91	9	8	0.73 (0.54-0.87)	0.91(0.83-0.95)
MTBC	52	77	0	1	0.98 (0.89-1)	1(0.95-1)
<i>M. Tuberculosis</i>	47	78	1	4	0.92(0.81-0.97)	0.98 (0.93-1)

Estos resultados muestran 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 las diferentes dianas (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción para la región 16S rRNA, las secuencias de inserción *IS6110* e *IS1081* y la región TbD1 (tasa de positividad $\geq 95\%$).

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 entre ninguna de las especies:

Pruebas de reactividad cruzada

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

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR MTBC/NTM para la especie *M. tuberculosis* ha sido evaluado frente a DNA extraído de las cepas de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331 y *Mycobacterium tuberculosis* X004439, y diversas cepas clínicas con *M. tuberculosis* pertenecientes a los linajes 1, 2, 3, y 4 (sublinaje T, sublinaje LAM, y sublinaje X), obteniéndose resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR MTBC/NTM para el género *Mycobacterium* ha sido evaluado frente a DNA extraído de cepas de referencia (*Mycobacterium bovis* AF

2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium xenopi*, de cepas clínicas (*Mycobacterium tuberculosis* linajes 1, 2, 3, y 4 (sublinaje T, sublinaje LAM, y sublinaje X), *Mycobacterium africanum* linajes 5 y 6, complejo *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, complejo *Mycobacterium chelonae* (grupo III-*M. abscessus*), *Mycobacterium intracellulare*), así como de muestras clínicas (*Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chimaera-intracellulare*), obteniéndose resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR MTBC/NTM para el complejo de *M. tuberculosis* ha sido evaluado frente a DNA extraído de las cepas de referencia (*Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*), así como de cepas clínicas (*Mycobacterium tuberculosis* linajes 1, 2, 3, y 4 (sublinaje T, sublinaje LAM, y sublinaje X), y *Mycobacterium africanum* linajes 5 y 6), obteniéndose resultados positivos.

Termocicladores compatibles

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- 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)

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

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de cultivo de micobacterias, aislados clínicos de micobacterias y muestras de esputo descontaminado de pacientes con baciloscopia positiva o negativa. El uso de otras muestras no se ha establecido.

- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el MTBC/NTM Positive Control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido la extracción de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante; g) mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas del género *Mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o de la especie *M. tuberculosis*.
- La detección del DNA puede no indicar la presencia de bacterias viables y/o infecciosas o que estas bacterias sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por el género *Mycobacterium*, del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o de la especie *M. tuberculosis* y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar las bacterias.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con el género *Mycobacterium*, el complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y/o la especie *M. tuberculosis*., y se han descartado otras enfermedades respiratorias, la posibilidad de un resultado

falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.

- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Adjunto III. Configuración valores de exposición

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

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
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 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

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- 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.

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 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 professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.

- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR MTBC/NTM has been tested on mycobacterial culture, clinical isolates of mycobacteria and decontaminated sputum (with positive or negative acid-fast bacilli (AFB) smear). Other sample types must be validated by the user.

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

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

- CDC (Specimen collection guidelines. Website: <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>)
- IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94)
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en

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

For sputum samples, the recommended amount of sputum is approximately 200µL that can be pipetted.

DNA extraction

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

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

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 µL) can increase the DNA concentration.

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized MTBC/NTM Positive Control (red tube) in the 100 µL 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 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative control (yellow tube) or reconstituted positive control (red tube) and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Insertion sequences IS6110 and IS1081 - *M. tuberculosis* complex), ROX (16S rRNA - genus mycobacterium), Cy5 (TbD1 region - *M. tuberculosis* specie) and HEX, JOE, or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (Attached II).

Analysis and interpretation of results

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

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

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

Positive control

The positive control used in each run, must show an amplification curve ($Ct \leq 40$) for FAM, ROX and Cy5, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run, must show the signal absence ($Ct > 40$ or no signal) in FAM, ROX and Cy5 which validates the reaction.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal ($Ct \leq 40$) in positive and negative controls wells.

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

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

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

Sequences IS6110 and IS 1081 (FAM)	16S rRNA (ROX)	TbD1 Region (Cy5)	Internal Control (HEX)	Interpretation	
+	+	+	+/- ¹	Valid	<p><i>M. tuberculosis</i> specie Positive (If Ct FAM < Ct ROX) ³</p> <p>or NTM Positive (If Ct ROX < Ct FAM and Cy5) ³</p>
+	- #	+	+/- ¹	Valid	<p><i>M. tuberculosis</i> specie Positive (If Ct FAM > 35) ³</p> <p>If Ct FAM < 35, repeat the assay depending on the available material:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) obtain a new specimen, re-extract, and retest (ideally) or, b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, c) repeat qPCR with the same isolated DNA sample. <p>After retesting one time, if the result is maintained, the sample should be considered positive for <i>M. tuberculosis</i> specie</p>
+	- #	- #	+/- ¹	Valid	<p>MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> Positive (If Ct FAM > 35) ³</p> <p>If Ct FAM < 35, repeat the assay depending on the available material:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) obtain a new specimen, re-extract, and retest (ideally) or, b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, c) repeat qPCR with the same isolated DNA sample.

					After retesting one time, if the result is maintained, the sample should be considered positive for MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i>
+	+	-	+/- ¹	Valid	MTBC strains different from <i>M. tuberculosis</i> Positive (If Ct FAM = Ct ROX and/or if Ct FAM < Ct ROX) ³ or NTM Positives (If Ct FAM > Ct ROX) ³
-	+ [†]	-	+/- ¹	Valid	NTM Positive (In case Cy5 amplifications appear with a Ct > 37, the sample should be considered as NTM Positive)
-	-	-	+ ²	Valid	Targets not detected ²
-	-	-	- ²	Invalid	Test failed ²

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

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

NTM = non-tuberculous mycobacteria

MTBC= *M. tuberculosis* complex

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

#: 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 channel or ROX and Cy5. This result also indicates the presence of a different MTBC strain from the *M. tuberculosis* or *M. tuberculosis* species.

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

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

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

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

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. 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 14 positive NTM samples, 15 positive MTBC samples and 24 positive *M. tuberculosis* samples. The results obtained with Vitassay qPCR MTBC/NTM were compared with those obtained with the reference methods in the diagnosis of active tuberculosis (culture) and are shown below:

Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP
NTM	14	38	0	0	1 (0.76-1)	1 (0.9-1)
MTBC	15	37	0	0	1(0.78-1)	1(0.9-1)
<i>M. Tuberculosis</i>	24	27	0	1	0.96 (0.79-0.99)	1 (0.87-1)

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 22 NTM positive samples, 52 MTBC positive samples and 47 *M. tuberculosis* positive samples. These results were compared with those obtained

with the reference method consisting of characterization with culture and identification of NTM species with INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2 (Fujirebio) in patients with NTM respiratory infection, and in patients diagnosed with TB, MTBC was identified with SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid test (Abbott). The obtained results are shown below:

Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP
NTM	22	91	9	8	0.73 (0.54-0.87)	0.91(0.83-0.95)
MTBC	52	77	0	1	0.98 (0.89-1)	1(0.95-1)
<i>M. Tuberculosis</i>	47	78	1	4	0.92(0.81-0.97)	0.98 (0.93-1)

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

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined from serial dilutions (1:10) of the template DNA of the different targets (10^7 - 10^1 copies/reaction). This assay has a detection limit of 10 DNA copies per reaction for the 16S rRNA region, the *IS6110* and *IS1081* insertion sequences and the TbD1 region (positivity rate $\geq 95\%$).

Analytical specificity

The analytical specificity for MTBC/NTM detection was confirmed by testing a panel composed of different microorganisms. No cross-reactivity was observed between any of the species:

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

Analytical reactivity

Vitassay qPCR MTBC/NTM kit's analytical reactivity for the specie *M. tuberculosis* was evaluated against DNA extracted from reference strains (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331 and *Mycobacterium tuberculosis* X004439) and from clinical strains containing *M. tuberculosis* lineages 1, 2, 3, and lineage 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage), showing positive results.

Vitassay qPCR MTBC/NTM kit's analytical reactivity for the *Mycobacterium* genus was evaluated against DNA extracted from reference strains (*Mycobacterium bovis* AF

2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium xenopi*), from clinical strains (*Mycobacterium tuberculosis* lineage 1, 2, 3, and 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage), *Mycobacterium africanum* lineage 5 and 6, *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Mycobacterium chelonae* complex (group III- *M. abscessus*), *Mycobacterium intracellulare*) and from clinical samples (*Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chimaera-intracellulare*), showing positive results.

Vitassay qPCR MTBC/NTM kit's analytical reactivity for MTBC strains was evaluated against DNA extracted from reference strains (*Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum* and *Mycobacterium microti*), as well as from clinical strains (*Mycobacterium tuberculosis* lineage 1, 2, 3, and 4 (T sublineage, LAM sublineage, and X sublineage), and *Mycobacterium africanum* lineage 5 and 6), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- 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)

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

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from mycobacterial culture, clinical isolates of mycobacteria and decontaminated sputum (with positive or negative acid-fast bacilli (AFB) smear). The use of other samples has not been established.

- The correct test performance depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination, either by the MTBC/NTM Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or by PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including DNA extraction); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) pathogen load below the limit of detection for the assay; e) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures; g) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown variants of *M. tuberculosis* complex (MTBC), the genus *Mycobacterium*, and the specie *M. tuberculosis*.
- DNA detection may not indicate the presence of viable and/or infectious bacteria or that these bacteria are the causative agents for clinical symptoms.
- The negative results do not preclude *M. tuberculosis* complex (MTBC), the genus mycobacterium, and the specie *M. tuberculosis* infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimum specimen types for these pathogen's identification and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the bacteria.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible *M. tuberculosis* complex (MTBC), the genus *Mycobacterium*, and the specie *M. tuberculosis* infection, and other respiratory diseases have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type, and its previous treatment, among others.

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

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

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
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®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range 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

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/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

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



VIA Vitassay

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

www.vitassay.com