



Real-Time PCR Kits

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

Reactivos suministrados

Para las referencias 7041048 y 7042048:

Materiales suministrados					
Código	Reactivo/Material	Descripción	Rango de concentración	Color	Cantidad
7041S048/ 7042S048	MTBC/NTM strips low/high profile	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL *	Blanco (opaco)	4 tiras de 8 pocillos
		dNTPs	± 1 mM *		
		Cebadores y sondas	0,2-1 nMol/ μ L *		
		Enzimas	10-100 U/rxn *		
7C048	MTBC/NTM Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L *	Rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	Solución salina	± 13 mM	Verde	1 vial x 1,8 mL
		Tampón (TRIS, pH)	± 67 mM		
7003N	Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	Tapas ópticas para sellar los pocillos en el ciclo térmico	-	Transparente	4 tiras de 8 tapones

* Para los componentes en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits (antes del uso) puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez en uso, compruebe las condiciones de almacenamiento de cada componente. El ensayo debe realizarse a temperatura ambiente. Evitar agitaciones durante el transporte para prevenir la fuga de líquidos.
- Para el uso adecuado de las tiras, se recomienda no rehidratar los pocillos que no se necesiten. Los pocillos no utilizados pueden cortarse fácilmente antes de retirar el aluminio protector y almacenarse en las bolsas de aluminio proporcionadas con el gel de sílice dentro y cerrados para evitar el contacto con la luz o la humedad y guardarse a 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez que los pocillos han sido rehidratados, debe realizarse de forma inmediata la adición del ácido nucleico y la qPCR.
- El control positivo resuspendido debe utilizarse inmediatamente o almacenarse a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. La estabilidad del control positivo se ha validado tras 6 ciclos de

congelación y descongelación. Sin embargo, se recomienda distribuir en alícuotas para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

- Una vez abiertos, los componentes Resuspension buffer, PCR grade water y Negative Control deben ser almacenados a 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.
- Conservar todos los reactivos en oscuridad.
- Una vez extraído el ácido nucleico de la muestra, el eluido se puede almacenar hasta 24 horas a 4°C o 25°C o hasta un mes a -20°C antes de agregarlo al ensayo qPCR.

Material y equipamiento necesario, 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 (Termociclador)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de pocillos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo
- Blanco de muestra
- Vitassay qPCR Colour Compensation. Solo si se utiliza el analizador LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics).

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 de la prueba

Vitassay qPCR MTBC/NTM se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen 16S rRNA, de las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 y de la región de la delección TbD1. 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 cebadores 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 cebadores, 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 verifica si la reacción de amplificación funciona correctamente. Si la reacción PCR se inhibe por la presencia de un artefacto/inhibidor o porque el pocillo está incorrectamente rehidratado, este control puede resultar negativo.

Los canales de detección de las secuencias diana se describen a continuación:

Diana	Canal detección
Secuencias de inserción IS6110 e IS1081	FAM
16S rRNA	ROX
Control Interno (CI)	HEX* (según el equipo utilizado)
Región de la delección TbD1	Cy5

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 utilizar el kit sin haber leído y entendido la información sobre procedimientos, precauciones y limitaciones proporcionada en las instrucciones de uso.
- 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.
- Utilizar las tiras inmediatamente después de haber retirado el aluminio protector para proteger la mezcla de reacción de la luz solar. No se recomienda dejar las tiras abiertas sin resuspender. Una vez rehidratados los pocillos requeridos, se debe llevar a cabo el ensayo qPCR inmediatamente.
- Se recomienda cortar los pocillos requeridos/necesarios antes de retirar el sello protector de toda la tira. Guardar el resto dentro de la bolsa con el desecante.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip después de cada uso (no retirar las bolsas de desecante del sobre). Elimine el exceso de aire de las bolsas antes de sellar.
- No usar el producto cerca de disolventes, con el fin de evitar el deterioro de la etiqueta/marcaje.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Rehidratar los viales inmediatamente después de abrir el sobre del Control positivo y utilizarlos en la reacción de PCR o conservarlos adecuadamente. Dejar el vial abierto sin resuspender puede ocasionar el deterioro del reactivo.
- 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. Una vez finalizada la prueba lávese bien las manos.
- 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.
- 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.
- 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 libres de RNasa/DNasa. Para cada muestra debe usarse una punta nueva. Es necesario cambiar de guantes antes de manipular los reactivos.
- 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.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- El producto **Vitassay qPCR MTBC/NTM** solamente se ha validado con los equipos mencionados en el Apartado Flujos de Trabajo validados de estas Instrucciones de uso.
- Debe asegurarse de que la configuración de las condiciones en el termociclador se realiza siguiendo las instrucciones de la sección "Programación del termociclador".
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), los kits Vitassay qPCR no requieren ficha de datos de seguridad debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Una declaración en la que se afirme el no requerimiento de la ficha de datos de seguridad de los materiales, y el certificado de análisis se pueden facilitar previa solicitud (no incluido).

- Para advertencias, precauciones y procedimientos adicionales, consulte el manual del instrumento de PCR en tiempo real.

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 colonias clínicas aisladas de micobacterias, así como en esputos descontaminados (con resultados positivo o negativo para la prueba de bacilos acidorresistentes (BAAR)). El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras 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 en una bolsa de riesgo biológico 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^{1 2}. Las muestras pueden almacenarse a 4°C hasta 24 horas^{1 2} o conservarse congeladas a -20°C o menos (a -70°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 clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con guías de laboratorio apropiadas y/o con los manuales de políticas de laboratorio de microbiología. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- 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).

Nota: las condiciones de recolección, transporte y almacenamiento de muestras indicadas anteriormente se sugieren en base a las recomendaciones para muestras de esputo destinadas a ser utilizadas para la detección de ácidos nucleicos, tal como aparecen en el informe referenciado de recomendaciones de la SEIMC para la recogida y transporte en microbiología clínica, y en la guía autorizada IDSA anteriormente referenciada. Sin embargo, recomendamos seguir las pautas del laboratorio y/o el manual de políticas del laboratorio de microbiología para el transporte y la conservación adecuados de las muestras.

Flujos de trabajo validados

Vitassay qPCR MTBC/NTM ha sido validado con colonias clínicas aisladas de micobacterias, y esputos descontaminados (con resultados positivo o negativo para la prueba de bacilos acidorresistentes (BAAR)) con los siguientes flujos de trabajo:

¹ 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.

² García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Flujo de trabajo	Extracción	Análisis
1	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2		LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics)
3		7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)
4	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento con los kits Vitassay qPCR.

Para más información sobre la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, póngase en contacto con el fabricante (info@vitassay.com).

En caso de utilizar un flujo de trabajo diferente a los mencionados anteriormente, la validación del nuevo flujo de trabajo deberá ser realizada por el usuario final, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

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.

Para mejorar el manejo, el rendimiento y la calidad del DNA bacteriano extraído a partir de las muestras de esputo, se recomienda un pretratamiento de la muestra con acetilcisteína para facilitar el pipeteo. Para la evaluación del rendimiento, se añadió la acetilcisteína 1M en proporción 1-1 (volumen) a la muestra, y la mezcla resultante se incubó a 96°C durante 10 minutos. Si tras este procedimiento no se consiguió la suficiente liquidez de la muestra para su utilización, se añadió más acetilcisteína a la muestra, aumentando el tiempo de incubación 10 minutos más.

Tener en cuenta que los controles positivo y negativo no deben ser extraídos. Sin embargo, para monitorizar o controlar el proceso de extracción y descartar posibles contaminaciones, se puede extraer un blanco de muestra (no suministrado en el kit) siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las muestras clínicas. El blanco de muestra debería consistir en la misma matriz (real o simulada) que las muestras clínicas, previamente caracterizado como negativo para todas las dianas.

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del MTBC/NTM Positive Control (tubo rojo) con 400 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 en cada carrera).

- 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 las tapas ópticas suministradas. Se recomienda centrifugar brevemente.
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través del canal FAM (Secuencias de inserción IS6110 e IS1081), ROX (16S rRNA), Cy5 (región TbD1) y los canales HEX (Control Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado. Para más información sobre los canales de detección más habituales, póngase en contacto con el fabricante (info@vitassay.com).

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 comprobar la emisión de señal de control interno (CI).

Para cada ensayo, se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final. Para ello, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo para cada canal y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). En el caso de que el equipo utilizado establezca un umbral automáticamente, compruebe y verifique que está ajustado al control positivo o ajústelo manualmente. Una vez fijado el valor umbral, se pueden interpretar las muestras del ensayo.

La naturaleza química de los diferentes fluoróforos puede afectar al valor umbral de los diferentes canales, así como las diferentes intensidades de señal pueden influir en el valor umbral para diferentes instrumentos.

Además, se recomienda incluir un blanco (muestra negativa para las dianas detectadas confirmada, de la misma matriz que las muestras analizadas) con el fin de establecer la línea de base del ensayo.

Para que una prueba diagnóstica sea válida, antes de analizar el resultado de las muestras clínicas deben cumplirse las siguientes condiciones de control:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación ($C_t \leq 40$) en los canales FAM (IS6110 e IS1081), y Cy5 (región TbD1) y una curva de amplificación ($C_t \leq 38$) en el canal ROX (16S rRNA), lo que valida la reacción.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal ($C_t > 40$ o no señal) en los canales FAM (IS6110 e IS1081), y Cy5 (región TbD1) y ausencia de señal ($C_t > 38$ o no señal) en el canal ROX (16S rRNA), lo que valida la reacción.

El control interno (CI) debe mostrar una señal de amplificación ($C_t \leq 40$) en los pocillos de control positivo y control negativo, lo que valida la reacción.

El experimento es inválido si hay ausencia de señal en el pocillo del control positivo para cualquiera de las dianas o hay señal de amplificación en el pocillo del control negativo, exceptuando en el canal HEX que debe mostrar amplificación (correspondiente al CI). En cualquiera de estos supuestos, el ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles, para la interpretación de los resultados de las muestras, **seleccione sólo los canales donde se detectan las dianas** y con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados:

Secuencias <i>IS6110</i> e <i>IS1081</i> (FAM)	16S rRNA (ROX)	Región TbD1 (Cy5)	Control Interno (HEX)	Interpretación para muestras		
				Resultado	Consideraciones sobre los valores Ct	Interpretación
+	+	+	+ ¹	Válido	valor Ct FAM < valor Ct ROX < valor Ct Cy5 ³ [$\Delta Ct_{ROX-FAM}$ y $\Delta Ct_{Cy5-ROX}$ < 3]	Positivo en cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i>
					valor Ct FAM ≤ valor Ct ROX < valor Ct Cy5 ³ [$\Delta Ct_{ROX-FAM}$ < 1 y $\Delta Ct_{Cy5-ROX}$ > 3]	Positivo en cepas MTBC diferentes de cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i> + coinfección con cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i>
					valor Ct canal ROX < valor Ct canales FAM y Cy5 ³	Positivo en NTM + coinfección con cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i>
+	+	-	+ ¹	Válido	valor Ct FAM ≈ valor Ct ROX ³ [$\Delta Ct_{ROX-FAM} \pm 1$]	Positivo en cepas MTBC diferentes de cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i>
					valor Ct FAM > valor Ct ROX ³ [$\Delta Ct_{FAM-ROX}$ > 1]	Positivo en NTM + coinfección con cepas MTBC diferentes de cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i>
+	-	+	+ ¹	No concluyente	Si el valor Ct FAM > 35 ³	Por favor repita la prueba ⁴ Si el resultado se mantiene tras la repetición, la muestra debe considerarse como presuntamente positiva a cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i> a concentraciones menores que la del LoD de la prueba. Si el valor Ct en ROX ≤ 40, la muestra debe considerarse como positiva a cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i>
					valor Ct FAM < 35 ³	Por favor repita la prueba ⁴
+	-	-	+ ¹	No concluyente	valor Ct FAM > 35 ³	Por favor repita la prueba ⁴ Si el resultado se mantiene tras la repetición, la muestra debe considerarse como presuntamente positiva a cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i> o a cepas MTBC diferentes a cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i> , a concentraciones menores a las del LoD de la prueba. Si el valor Ct en ROX ≤ 40, la muestra debe considerarse como positiva a cepas MTBC diferentes a cepas modernas de <i>M. tuberculosis</i>
					valor Ct FAM < 35 ³	Por favor repita la prueba ⁴
-	+ [†]	+	+ ¹	Inválido	-	Por favor repita la prueba ⁴

-	+ †	-	+ ¹	Válido	-	Positivo en NTM
-	-	+	+ ¹	Inválido	-	Por favor repita la prueba ⁴
-	-	-	+ ²	Válido	-	Dianas no detectadas ²
-	-	-	- ²	Inválido	-	Test fallido ²

MTBC = cepas del complejo *M. tuberculosis*; **NTM** = micobacterias no tuberculosas (de sus siglas en inglés: non-tuberculous mycobacteria).

Para Secuencias IS6110 e IS1081 - Región Tbd1 – Control interno

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40) excepto para ²

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal) excepto para ²

Para 16S rRNA

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤38)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >38 o no señal)

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

¹ El control interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40). En ocasiones, la detección del control interno no ocurre, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. En este caso, la reacción se considera 'Inválida' y se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.

² En el caso de que la detección de los genes diana 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 "invalido" 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, siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.

³ Solo se tendrá en consideración el valor entero del Ct. Si el valor Ct dado por el equipo de PCR tiene decimales, se necesitará redondear al valor entero más cercano.

⁴ En caso de un resultado poco claro, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado, 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 extraer y 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

Linealidad analítica

La linealidad analítica se determinó analizando diluciones seriadas 1:10 de concentración conocida (10^7 a 10^1 copias por reacción) de DNA específico y sintético perteneciente a los genes diana para detectar cepas del complejo *M. tuberculosis*, del género *mycobacterium*, y de la especie *M. tuberculosis*. A continuación, se muestra un ejemplo de la gráfica de amplificación resultante de un ensayo realizado en el CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

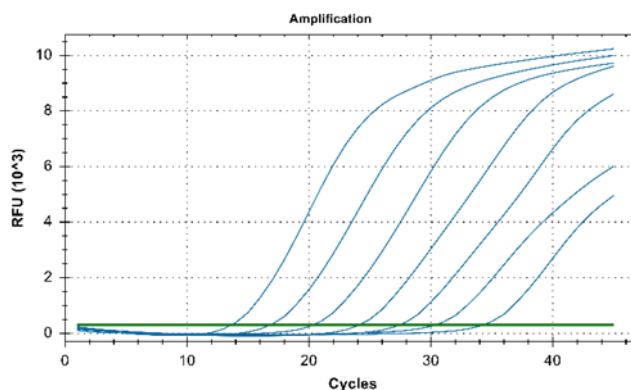


Figura 1. Experimento con diluciones seriadas de un estándar de DNA de las secuencias de inserción IS6110 y IS1081 realizado en el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).

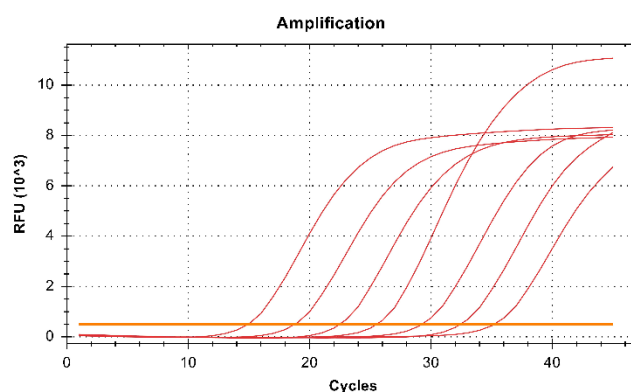


Figura 2. Experimento con diluciones seriadas de un estándar de DNA del gen 16S rRNA realizado en el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal ROX).

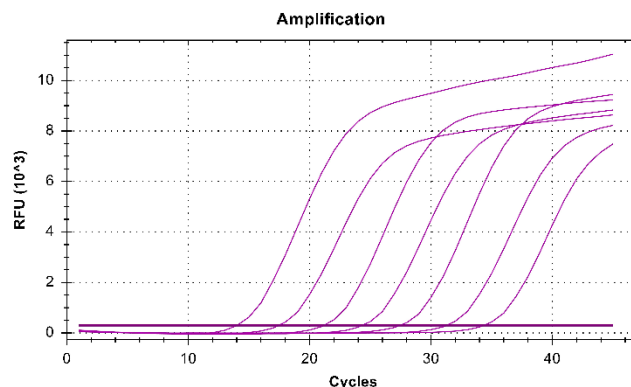


Figura 3. Experimento con diluciones seriadas de un estándar de DNA de la región de la delección TbD1 realizado en el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal Cy5).

La linealidad también se determinó analizando las mismas diluciones con el equipo LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics), y 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), y se observó el mismo nivel de detección que el obtenido con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) en todo el rango estudiado.

Sensibilidad analítica. Límite de Detección (LoD)

La Sensibilidad Analítica o Límite de detección (LoD) de Vitassay qPCR MTBC/NTM se analizó utilizando colonias clínicas aisladas de micobacterias, y muestras de esputo. Las muestras fueron extraídas y analizadas utilizando los flujos de trabajo mencionados en el apartado Flujos de trabajo validados de estas Instrucciones. Vitassay qPCR MTBC/NTM mostró el límite de detección indicado en la siguiente tabla, con una tasa de positivos de $\geq 95\%$.

LOD						
Flujo de trabajo	<i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv		<i>M. bovis</i> (BCG)		<i>M. smegmatis</i> cepa mc2155	
	Colonias clínicas aisladas	Esputo	Colonias clínicas aisladas	Esputo	Colonias clínicas aisladas	Esputo
1	0,2 UFC/rxn (0,02 UFC/ μ L)	1,6 UFC/rxn (0,16 UFC/ μ L)	32 UFC/rxn (3,2 UFC/ μ L)	50 UFC/rxn (5 UFC/ μ L)	10 UFC/rxn (1 UFC/ μ L)	40 UFC/rxn (4 UFC/ μ L)
2	0,4 UFC/rxn (0,04 UFC/ μ L)	1,6 UFC/rxn (0,16 UFC/ μ L)	16 UFC/rxn (1,6 UFC/ μ L)	100 UFC/rxn (10 UFC/ μ L)	20 UFC/rxn (2 UFC/ μ L)	80 UFC/rxn (8 UFC/ μ L)
3	0,4 UFC/rxn (0,04 UFC/ μ L)	0,8 UFC/rxn (0,08 UFC/ μ L)	16 UFC/rxn (1,6 UFC/ μ L)	50 UFC/rxn (5 UFC/ μ L)	20 UFC/rxn (2 UFC/ μ L)	80 UFC/rxn (8 UFC/ μ L)
4	0,2 UFC/rxn (0,02 UFC/ μ L)	1,6 UFC/rxn (0,16 UFC/ μ L)	16 UFC/rxn (1,6 UFC/ μ L)	50 UFC/rxn (5 UFC/ μ L)	10 UFC/rxn (1 UFC/ μ L)	80 UFC/rxn (8 UFC/ μ L)
5	0,4 UFC/rxn (0,04 UFC/ μ L)	0,8 UFC/rxn (0,08 UFC/ μ L)	32 UFC/rxn (3,2 UFC/ μ L)	100 UFC/rxn (10 UFC/ μ L)	20 UFC/rxn (2 UFC/ μ L)	40 UFC/rxn (4 UFC/ μ L)

Tabla 1. Resultados LoD obtenidos con Vitassay qPCR MTBC/NTM kit, utilizando los flujos de trabajo validados con colonias clínicas aisladas, y muestras de esputo contaminados con material de referencia para especies del complejo *M. tuberculosis*, del género mycobacterium, y de la especie *M. tuberculosis*. UFC = Unidades Formadoras de Colonias, rxn = reacción.

Rango de medición

El rango de medición del ensayo se determinó probando una serie de diluciones 1:10 que contenían una concentración conocida de DNA específico y sintético perteneciente a los genes diana para detectar cepas del complejo *M. tuberculosis*, del género mycobacterium, y de la especie *M. tuberculosis*, y matizado con los experimentos de LoD. Los resultados permitieron confirmar la correcta detección de las dianas en el rango de medición indicado en la siguiente tabla:

Rango de medición (copias/reacción)		
Diana secuencias IS6110 e IS1081	10 ⁹	10
Diana gen 16S rRNA	10 ⁹	1,60
Diana región TbD1	10 ⁹	1,27

Tabla 2. Rango de medición evaluado con Vitassay qPCR MTBC/NTM kit.

En conclusión, el rango de medida de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit fue determinado satisfactoriamente según los criterios de aceptación para la validación inicialmente establecidos, asegurando la fiabilidad, exactitud y reproducibilidad de los resultados en un amplio espectro de cargas microbianas, y afirmando su utilidad en varios escenarios de diagnóstico clínico.

Exactitud

Veracidad (sesgo)

La veracidad de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit fue evaluada frente al material de referencia listado a continuación. En el caso de los DNA de referencia, fueron analizados con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

1. La Colección Americana de Cultivos Tipo (“ATCC®”):

- *Mycobacterium bovis* Cepa AF 2122/97 (Ref. BAA-935D-2)
- *Mycobacterium tuberculosis* Cepa H37Rv (Ref. 25618D)
- *Mycobacterium tuberculosis* Cepa TMC 331 (Ref. 35838D-2)
- *Mycobacterium tuberculosis* Cepa X004439 (Ref. BAA-2236D-2)
- *Mycobacterium africanum* (Ref. 25420DQ)
- *Mycobacterium microti* (Ref. 19422DQ)
- *Mycobacterium xenopi* Schwabacher Cepa TMC 1482 (Ref. 19250)

Las cepas de referencia del complejo *M. tuberculosis* procedentes de la ATCC, fueron extraídas (cuando aplicase) con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y analizadas con el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

2. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT):

- *Mycobacterium abscessus* HCUV-356153 (Ref. 8517)
- *Mycobacterium avium subsp. avium* MYCAVI 8058091 (Ref. 7407)
- *Mycobacterium gordonae* CCTM La 587 (Ref. 3029)
- *Mycobacterium kansasii* CCTM La 2401 (Ref. 3030)
- *Mycobacterium marinum* CIP 104528 (Ref. 7091)
- *Mycobacterium peregrinum* DSM 43271 (Ref. 3023)
- *Mycobacterium smegmatis* NCTC 8159 (Ref. 3020)

Las cepas de referencia de micobacterias no tuberculosas procedentes de la CECT, fueron analizadas con el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

3. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC):

- BCG Danish 1331 sub-cepa (Ref. 07/270)
- BCG Tokyo 172 sub-cepa (Ref. 07/272)
- BCG Russian BCG-I sub-cepa (Ref. 07/274)
- BCG Moreau-RJ sub-cepa (Ref. 10/272)

Las cepas de referencia del complejo *M. tuberculosis* procedentes del NIBSC, fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y analizadas con el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

4. Colonias clínicas caracterizadas:

- *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
- *Mycobacterium bovis* Vaccine BCG
- *Mycobacterium smegmatis* Cepa mc2155
- *Mycobacterium chelonae*
- *Mycobacterium fortuitum*
- *Mycobacterium marinum*
- *Mycobacterium scrofulaceum*

Las colonias clínicas caracterizadas del complejo *M. tuberculosis*, de la especie *M. tuberculosis*, y de micobacterias no tuberculosas, fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y analizadas con el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Precisión

Para determinar la precisión de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit, se realizaron ensayos intra-ensayos (repetibilidad), inter-ensayo (reproducibilidad), inter-lote y ensayos inter-termociclador. El panel de muestras se extrajo con MagDEA Dx SV Kit, empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y se analizó con el termociclador indicado en cada sección. En cada carrera, se incluyeron tanto un control positivo como uno negativo.

Intra-ensayo

El intra-ensayo se probó analizando réplicas de todas las muestras en la misma carrera utilizando Vitassay qPCR MTBC/NTM kit y el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en este ensayo.

Muestra	Diana	Canal	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	29,51	0,27	0,91
	Gen 16S rRNA	ROX	30,96	0,36	1,15
	Región de la delección TbD1	Cy5	32,48	0,22	0,69
Positiva 2 (3xLoD)	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	31,19	0,27	0,86
	Gen 16S rRNA	ROX	33,07	0,6	1,10
	Región de la delección TbD1	Cy5	34,20	0,80	2,35
Muestra Negativa	Inserciones IS6110 e IS1081 Gen 16S rRNA Región de la delección TbD1	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	22,08	0,12	0,53
Control Positivo	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	21,50	0,07	0,32
	Gen 16S rRNA	ROX	19,80	0,05	0,25
	Región de la delección TbD1	Cy5	21,05	0,02	0,09
Control Negativo	Inserciones IS6110 e IS1081 Gen 16S rRNA Región de la delección TbD1	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	22,60	0,14	0,60

Tabla 3. Resultados del intra-ensayo de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, NA = no aplica.

Inter-ensayo

El inter-ensayo se probó analizando réplicas de las diferentes muestras en tres días diferentes por tres operadores distintos con Vitassay qPCR MTBC/NTM kit, empleando el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). En las siguientes tablas se muestra un resumen de los resultados.

Muestra	Diana	Canal	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	29,69	0,53	1,78
	Gen 16S rRNA	ROX	32,19	0,79	2,44
	Región de la delección TbD1	Cy5	32,50	0,28	0,86
Positiva 2 (3xLoD)	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	31,49	0,51	1,62
	Gen 16S rRNA	ROX	33,94	0,83	2,45
	Región de la delección TbD1	Cy5	34,64	0,40	1,16
Muestra Negativa	Inserciones IS6110 e IS1081 Gen 16S rRNA Región de la delección TbD1	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	22,21	0,28	1,26
Control Positivo	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	21,86	0,37	1,71
	Gen 16S rRNA	ROX	20,94	0,58	2,77
	Región de la delección TbD1	Cy5	21,47	0,34	1,57
Control Negativo	Inserciones IS6110 e IS1081 Gen 16S rRNA Región de la delección TbD1	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	22,12	0,32	1,46

Tabla 4. Resultados del inter-ensayo de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, NA = no aplica.

Inter-lote

Los valores de inter-lote se determinaron analizando réplicas de diferentes muestras mediante el uso de tres lotes de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit en el CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Los resultados se describen en las siguientes tablas.

Muestra	Diana	Canal	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	29,29	0,20	0,70
	Gen 16S rRNA	ROX	31,67	0,26	0,82
	Región de la delección TbD1	Cy5	32,94	0,60	1,83
Positiva 2 (3xLoD)	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	31,18	0,19	0,61
	Gen 16S rRNA	ROX	33,63	0,45	1,35
	Región de la delección TbD1	Cy5	35,13	0,53	1,50
Muestra Negativa	Inserciones IS6110 e IS1081 Gen 16S rRNA Región de la delección TbD1	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	23,93	0,89	3,73
Control Positivo	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	21,68	0,27	1,26
	Gen 16S rRNA	ROX	21,06	0,37	1,78
	Región de la delección TbD1	Cy5	21,89	0,27	1,23

Control Negativo	Inserciones IS6110 e IS1081 Gen 16S rRNA Región de la delección TbD1	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	22,97	0,63	2,75

Tabla 5. Resultados del ensayo inter-lote de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, NA = no aplica.

Inter-termociclador

Los valores inter-termociclador fueron determinados con réplicas de las mismas muestras utilizadas para el intra-ensayo, inter-ensayo y ensayo inter-lote, utilizando Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. El DNA extraído de las muestras y los controles positivo y negativo, fueron analizados juntos en la misma carrera en los equipos CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics) y 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Los resultados obtenidos están descritos en la siguiente tabla.

Muestra	Diana	Canal	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	29,34	0,25	0,87
	Gen 16S rRNA	ROX	32,26	0,96	2,99
	Región de la delección TbD1	Cy5	33,16	0,57	1,72
Positiva 2 (3xLoD)	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	31,63	0,58	1,85
	Gen 16S rRNA	ROX	34,59	1,69	4,89
	Región de la delección TbD1	Cy5	35,33	0,53	1,51
Muestra Negativa	Inserciones IS6110 e IS1081 Gen 16S rRNA Región de la delección TbD1	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	23,36	0,71	3,05
Control Positivo	Inserciones IS6110 e IS1081	FAM	21,82	0,54	2,46
	Gen 16S rRNA	ROX	21,16	0,51	2,41
	Región de la delección TbD1	Cy5	22,14	0,51	2,32
Control Negativo	Inserciones IS6110 e IS1081 Gen 16S rRNA Región de la delección TbD1	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	22,02	1,46	6,61

Tabla 6. Resultados del ensayo inter-termociclador de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, NA = no aplica.

Especificidad y reactividad analítica

La especificidad y reactividad analítica se evaluaron para el producto Vitassay qPCR MTBC/NTM kit *in silico* y experimentalmente, empleando diferentes materiales de partida como cepas de referencia certificadas, RNA/DNAs de referencia certificados, así como material procedente de programas EQA.

Especificidad analítica

La especificidad analítica es la habilidad del ensayo para detectar la diana prevista. Hay dos componentes a tener en cuenta para la especificidad analítica: la reactividad cruzada y la interferencia. La reactividad cruzada puede ocurrir cuando secuencias relacionadas genéticamente están presentes en un espécimen de paciente, mientras que la interferencia puede ocurrir si la presencia de sustancias específicas potencialmente presentes en las matrices de las muestras afecta al rendimiento de la qPCR.

Reactividad cruzada: ensayo *in silico*

La reactividad cruzada se evaluó utilizando secuencias de referencia de microorganismos del NCBI GenBank, y un software de análisis bioinformático interno. Se llevó a cabo un análisis BLAST sobre cada cebador y sonda en la base de datos NCBI Genbank Nucleotide, así como un análisis bioinformático interno. Las secuencias alineadas con un porcentaje de alineamiento inferior al 80% de homología se consideraron improbables de ser detectadas. Los resultados mostrados se refieren a secuencias con un porcentaje de homología superior al 80%.

Todas las secuencias analizadas con el conjunto de cebadores y sonda para el complejo *M. tuberculosis* y para la especie *M. tuberculosis* mostraron un porcentaje de homología inferior al 80%.

En cuanto al conjunto de cebadores y sonda para la detección de secuencias del género mycobacterium, se encontró una secuencia con homología superior al 80%: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (Ref. NZ_JIAH01000003.1) con un porcentaje de homología del 95,08%.

Para comprobar la posible detección de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, se llevó a cabo un análisis complementario con 2.704 secuencias de *C. pseudodiphtheriticum* procedentes de la base de datos NCBI GenBank. Como resultado del análisis, se detectaron 79 secuencias, mostrando una homología del 95,08% con el gen 16S rRNA.

Por tanto, los diseños Vitassay para las dianas del complejo *M. tuberculosis*, micobacterias no tuberculosas, y la especie *M. tuberculosis* deberían dar lugar a una detección correcta, teniendo en cuenta que *C. pseudodiphtheriticum* podría detectarse también como un miembro mycobacterium.

Especificidad analítica: ensayo experimental

Reactividad cruzada: ensayo experimental

La reactividad cruzada de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit fue confirmada testando un panel de diferentes microorganismos asociados enfermedades respiratorias con los que la mayoría de la población se ha infectado, o flora presente en el tracto respiratorio. Cuando fue posible, y cuando los datos de concentración estaban disponibles, los microorganismos se evaluaron a niveles médicamente relevantes (generalmente 10^5 - 10^6 ufc/mL para bacterias y 10^4 - 10^5 ufp/mL para virus).

Se observó reactividad cruzada con *C. pseudodiphtheriticum* en el canal ROX (que sirve para la detección de la diana del género mycobacterium), en concordancia con los estudios *in silico*. Este microorganismo puede presentarse como miembro de la flora comensal del tracto respiratorio, pero ha demostrado tener relevancia clínica cuando se cultiva a partir de muestras procedentes del tracto respiratorio inferior de pacientes sintomáticos³. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno del resto de microorganismos testados, excepto con los microorganismos diana que detecta el ensayo.

³ Van Roeden, S. E., Thijsen, S. F., Sankatsing, S. U. C., & Limonard, G. J. M. (2015). Clinical relevance of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in lower respiratory tract specimens. *Infectious Diseases*, 47(12), 862–868.

Pruebas de reactividad cruzada			
Adenovirus tipo 1	-	Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1); Influenza B/Florida/04/06	-
Adenovirus tipo 2 cepa Adenoid 6	-	<i>Legionella bozemanii</i> serovar 1	-
Adenovirus tipo 3 cepa GB	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Adenovirus tipo 4 cepa RI-67	-	<i>Legionella longbeache</i>	-
Adenovirus tipo 5	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
Adenovirus tipo 8	-	<i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 1	-
Adenovirus tipo 15 cepa CH.38	-	Human metapneumovirus A1	-
Adenovirus tipo 31 cepa 1315/63 (NIAID V-231-001-014)	-	Human metapneumovirus A2	-
Adenovirus tipo 40 cepa Dugan	-	Human metapneumovirus B2	-
Adenovirus tipo 41 cepa Tak (73-3544)	-	MERS Coronavirus	-
Bocavirus	-	<i>Moraxella catharralis</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Mycobacterium abscessus</i>	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Mycobacterium abscessus</i> cepa HCUV-356153	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Mycobacterium africanum</i>	-/+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Mycobacterium avium</i>	-/+
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> , cepa MYCAVI 8058091	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotipo A	-	complejo <i>Mycobacterium avium</i>	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotipo C	-	<i>Mycobacterium bovis</i>	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> cepa CM-1	-	<i>Mycobacterium bovis</i> cepa AF2122/97	-/+
Coronavirus cepas HKU1, NL63, OC43 y 229E	-	<i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG	-/+
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> cepa 153	-/+*	<i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG, Danish 1331 sub-cepa	-/+
Enterovirus Coxsackievirus A9, A24 y B3	-	<i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG, Moreau-RJ sub-cepa	-/+
Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG, Russian BCG-I sub-cepa	-/+
Enterovirus tipos 68 y 71	-	<i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG, Tokyo 172 sub-cepa	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> cepa Minn A	-	<i>Mycobacterium bovis</i> cepa vaccine BCG	-/+

Pruebas de reactividad cruzada			
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Mycobacterium chelonae</i>	-/+
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus (cepa de vacuna)	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-/+
Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus	-	<i>Mycobacterium gordonae</i> cepa CCTM La 587	-/+
Influenza estacional A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus (cepa de vacuna)	-	<i>Mycobacterium kansasii</i>	-/+
Influenza estacional A/Thüringen/5/2017 (Clado 3C2a.1) (aislado de paciente)	-	<i>Mycobacterium kansasii</i> cepa CCTM La 2401	-/+
Cepa similar a Influenza A/California/7/2009 (H1N1): (NYMC X-179A); Influenza A/Perth/16/2009 (H3N2) (NYMC X-187) (A/Victoria/210/2009); Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Mycobacterium marinum</i>	-/+
Influenza A/California/7/2009 (H1N1)pdm09: (NYMC X-179A); cepa similar a Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), (A/South Australia/55/2014, IVR-175); Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Mycobacterium marinum</i> cepa CIP 104528	-/+
Cepa similar a Influenza A/Michigan/45/2015(H1N1) pdm09 (Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180); cepa similar a Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) (Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B); Influenza B/Brisbane/60/2008, wild type	-	<i>Mycobacterium microti</i>	-/+
<i>Mycobacterium peregrinum</i> cepa DSM 43271	-/+	<i>Mycobacterium smegmatis</i> cepa NCTC 8159	-/+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-/+	<i>Mycobacterium xenopi</i> cepa TMC 1482 **	-/+
complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-/+	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> DR- resistente a Isoniazida	-/+	<i>Neisseria sicca</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> DR- y resistente a rifampicina	-/+	virus Parainfluenza tipos 1, 2, 3, 4	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a Isoniazida, Etambutol y a estreptomicina	-/+	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a rifampicina	-/+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Tipo A1	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> no resistente a rifampicina	-/+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a la isoniazida	-/+	Rhinovirus tipo C	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a rifampicina y a Isoniazida	-/+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a Fluoroquinolona	-/+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-

Pruebas de reactividad cruzada			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a Isoniazida, Rifampicina, Kanamicina y Fluoroquinolonas	-/+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	-/+	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepa TMC 331	-/+	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepa X004439	-/+	Virus Respiratorio Sincitial tipos A y B	-
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	-/+	SARS-CoV-2 cepa 2019nCoV/USAWA1/2020	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-/+		

Tabla 7. Microorganismos de referencia utilizados en este estudio.

* Se observó reactividad cruzada con *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* en el canal ROX (que sirve para la detección de la diana del género mycobacterium).

** Tenga en cuenta que la detección de *M. xenopi* es dependiente de la concentración a la que se encuentre en la muestra.

Además, Vitassay qPCR MTBC/NTM kit se testó con concentraciones altas de una selección de diferentes microorganismos asociados a enfermedades respiratorias, junto con la presencia de todas las dianas detectadas por el kit Vitassay a una concentración cercana al LoD, con el objeto de verificar que la presencia de otros microorganismos respiratorios relacionados no alterará la detección de las dianas identificadas con el kit Vitassay. Los resultados obtenidos mostraron que solo la presencia de *M. pneumoniae* a concentraciones altas afectaría la detección de la especie *M. tuberculosis* (se ve afectado el canal Cy5) a una concentración cercana al LoD cuando se utiliza Vitassay qPCR MTBC/NTM kit.

Pruebas de reactividad cruzada			
<i>Chlamydia pneumoniae</i> cepa CM-1	+	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> (Designation: Philadelphia 1)	+
<i>Haemophilus influenzae</i> Designation: Rd [KW20]	+	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> [Sp264]	+
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Designation: Spain 23F1 [Sp264]	+

Tabla 8. Microorganismos de referencia testados en presencia de una cepa cuantificada, para todas las dianas detectadas con el kit Vitassay.

Análisis de la coinfección

Para evaluar principalmente las dificultades potenciales en la identificación de coinfecciones cuando dos de los microorganismos diana están presentes se realizó un análisis de coinfecciones. Para ello, se contaminó matriz verificada como negativa (esputo) con diferentes concentraciones (5xLoD, 50xLoD y 5000xLoD) de varias combinaciones de una cepa moderna de *M. tuberculosis*, una cepa del complejo *M. tuberculosis*, y una cepa representativa de micobacterias no tuberculosas. Las muestras fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y se analizaron utilizando el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Número de muestra	IS6110 e IS1081 (FAM)		gen 16S rRNA (ROX)		Región de la delección TbD1 (Cy5)		Promedio de las diferencias de los valores Ct	
	Ct promedio	SD	Ct promedio	SD	Ct promedio	SD	$\Delta Ct_{ROX-FAM}$	$\Delta Ct_{Cy5-ROX}$
1	29,84	0,42	31,84	0,74	33,41	0,36	2,01	1,57
2	26,37	0,37	28,27	0,10	30,14	0,15	1,90	1,87
3	32,81	0,33	31,95	0,36	-	-	-0,85	-
4	29,11	0,24	28,14	0,13	-	-	-0,97	-
5	-	-	35,52	0,96	-	-	-	-
6	-	-	31,42	0,28	-	-	-	-
7	29,17	0,21	31,20	0,22	33,05	0,32	2,03	1,85
8	26,23	0,17	27,83	0,13	30,04	0,05	1,60	2,21
9	28,26	0,38	28,76	0,26	33,10	0,06	0,50	4,33
10	26,08	0,36	28,50	0,11	29,66	0,12	2,42	1,16
11	29,47	0,33	31,86	0,35	33,43	0,43	2,39	1,57
12	26,11	0,46	28,38	0,07	29,81	0,09	2,27	1,43
13	29,84	0,29	30,15	0,19	33,16	0,24	0,31	3,01
14	26,21	0,09	28,66	0,13	29,91	0,16	2,46	1,25
15	32,44	0,36	32,22	0,38	-	-	-0,23	-
16	29,33	0,20	28,56	0,07	-	-	-0,77	-
17	32,66	0,34	30,31	0,25	-	-	-2,35	-
18	29,23	0,10	28,96	0,14	-	-	-0,27	-
19	21,49	0,24	21,31	0,14	33,15	0,32	-0,18	11,85
20	19,18	0,06	21,30	0,17	22,48	0,13	2,12	1,18
21	29,57	0,46	23,74	0,22	32,95	0,19	-5,83	9,21
22	19,28	0,21	21,73	0,22	22,84	0,17	2,45	1,11
23	33,10	0,22	23,99	0,27	-	-	-9,10	-
24	21,41	0,24	21,29	0,13	-	-	-0,12	-

Tabla 9. Valores Ct obtenidos en el ensayo de análisis de la coinfección para Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. Ct = ciclo umbral, SD = Desviación estándar (de sus siglas en inglés “Standard deviation”), $\Delta Ct_{ROX-FAM}$ = valor Ct ROX – valor Ct FAM; $\Delta Ct_{Cy5-ROX}$ = valor Ct Cy5 – valor Ct ROX.

Teniendo en consideración las dianas que debieran de mostrar señal de amplificación para cada tipo de microorganismo (como se muestra en la sección “Análisis e Interpretación de resultados” de estas Instrucciones), las posibilidades de coinfección difíciles de evaluar podrían ser:

- Coinfección de cepas modernas de *M. tuberculosis* + otros miembros del complejo *M. tuberculosis* versus cepas modernas de *M. tuberculosis* → habría amplificación en los tres canales de detección.
- Coinfección de cepas modernas de *M. tuberculosis* + micobacterias no tuberculosas versus cepas modernas de *M. tuberculosis* → habría amplificación en los tres canales de detección.
- Coinfección con otros miembros del complejo *M. tuberculosis* + micobacterias no tuberculosas versus otros miembros del complejo *M. tuberculosis* → las dianas de identificación del complejo *M. tuberculosis* y del género mycobacterium mostrarían amplificación.

En conjunto, los resultados mostraron que puede detectarse la presencia de miembros del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) diferentes a las cepas modernas de *M. tuberculosis* coinfectados con cantidades más bajas de cepas modernas de *M. tuberculosis*, así como la presencia de micobacterias no tuberculosas (NTM) coinfectadas con cantidades más bajas de cepas modernas de *M. tuberculosis* o de MTBC diferentes de las cepas modernas de *M. tuberculosis*, teniendo en cuenta las diferencias observadas de los valores Ct entre canales. Para la Interpretación de resultados de estas Instrucciones se ha tenido en cuenta un rango de estas diferencias de los valores Ct entre canales.

Interferencias e inhibidores de PCR

Se realizó un estudio de sustancias interferentes para probar el posible efecto de interferencia de sustancias endógenas y exógenas en Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. En total se han evaluado 23 sustancias potencialmente interferentes. Las muestras fueron extraídas empleando el MagDEA Dx SV Kit junto con el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y se amplificaron con el termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Como control de la prueba se utilizó la mezcla de reacción rehidratada sin ninguna sustancia interferente añadida, añadiéndose posteriormente el ácido nucleico extraído de la muestra simulada (Control Matriz Positiva (PMC)). Además, como Matriz Control Negativo (NMC), también se testó la matriz negativa sin sustancias potencialmente interferentes y sin microorganismos/material de referencia añadido.

Ensayo de evaluación de interferencias en qPCR sólo

Los resultados obtenidos fueron los siguientes cuando la sustancia potencialmente interferente se añadió directamente a la mezcla de reacción rehidratada, la cual también contiene el ácido nucleico previamente extraído de las muestras simuladas:

Sustancia	Concentración evaluada	Resultado
NMC	-	N.I
PMC	-	N.I
Acetaminofén / Paracetamol (dolocatil)	0,156 mg/mL	N.I
Albúmina	10 mg/mL	N.I
Sulfato albuterol (salbutamol)	4,5 x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Amoxicilina	8,40x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Benzocaína	0,75 mg/mL	N.I
Dextrometorfano	1,56 x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Eritromicina	0,138 mg/mL	N.I
Etambutol	0,03 mg/mL	N.I
Fluticasona	1,26 x10 ⁻⁶ mg/mL	N.I
DNA genómico	3,5 x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Isoniacida	6,00x10 ⁻² mg/mL	N.I
Mucina	2,5 mg/mL	N.I
Mupirocina	1,50x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Nicotina	7,5x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Hidrocloruro de oxymetazolina	0,1 mg/mL	N.I
Fenilefrina	3x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Rifampicina	1,20x10 ⁻² mg/mL	N.I
Cloruro sódico	0,9 mg/mL	N.I
Sulfametoxazol	0,28 mg/mL	N.I
Tobramicina	0,033 mg/mL	N.I
Triglicéridos	15 mg/mL	N.I
Trimetoprima	4,20x10 ⁻² mg/mL	N.I
Sangre completa	0,25 % (v/v)	N.I

Tabla 10. Sustancias potencialmente interferentes. N.I: Interferencias no notificables. v/v = relación volumen/volumen. NMC = matriz control negativo, PMC = matriz control positivo.

Evaluación de la interferencia en todo el proceso (extracción y qPCR)

Los resultados obtenidos fueron los siguientes cuando la sustancia potencialmente interferente se añadió a la muestra simulada que iba a extraerse, de la que el eluido obtenido fue añadido al ensayo qPCR:

Sustancia	Concentración evaluada	Resultado
NMC	-	N.I
PMC	-	N.I
Acetaminofén / Paracetamol (dolocatil)	0,156 mg/mL	N.I
Albúmina	10 mg/mL	N.I
Sulfato albuterol (salbutamol)	4,5 x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Amoxicilina	2,1x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Benzocaína	3 mg/mL	N.I
Dextrometorfano	1,56 x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I

Eritromicina	0,138 mg/mL	N.I
Etambutol	0,03 mg/mL	N.I
Fluticasona	1,26 x10 ⁻⁶ mg/mL	N.I
DNA genómico	3,5 x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Isoniacida	1,5x10 ⁻² mg/mL	N.I
Mucina	2,5 mg/mL	N.I
Mupirocina	1,50x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Nicotina	3,00x10 ⁻² mg/mL	N.I
Hidrocloruro de oxymetazolina	0,1 mg/mL	N.I
Fenilefrina	3x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Rifampicina	4,8x10 ⁻² mg/mL	N.I
Cloruro sódico	0,9 mg/mL	N.I
Sulfametoxazol	1,12 mg/mL	N.I
Tobramicina	0,033 mg/mL	N.I
Triglicéridos	15 mg/mL	N.I
Trimetoprima	4,20x10 ⁻² mg/mL	N.I
Sangre completa	1 % (v/v)	N.I

Tabla 11. Sustancias potencialmente interferentes. N.I: Interferencias no notificables. v/v = relación volumen/volumen. NMC = matriz control negativo, PMC = matriz control positivo.

En conclusión, se evaluaron diferentes sustancias potencialmente interferentes tanto endógenas como exógenas con Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. Los resultados obtenidos permiten concluir que no se observan interferencias para ninguna de las sustancias evaluadas a las concentraciones indicadas para cada condición.

Reactividad analítica

La reactividad analítica puede definirse como el porcentaje de cepas microbianas diana o muestras de DNA/RNA que dan un lugar a resultados positivos correctos. La reactividad analítica se estudió mediante análisis *in silico* y experimentales.

Reactividad analítica: análisis *in silico*

La reactividad analítica se evaluó utilizando secuencias de microorganismos del NCBI GenBank, y un software de análisis bioinformático interno, para demostrar que las secuencias diana pueden detectarse correctamente por el dispositivo en estudio.

Los análisis *in silico* del diseño de los cebadores y sonda se realizaron mediante alineamiento contra las secuencias disponibles en la base de datos NCBI GenBank, utilizando un software de análisis bioinformático interno. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Diana	% secuencias detectadas sin desajustes ("mismatches")	Nº secuencias
Cepas del complejo <i>M. tuberculosis</i>	100	201
Especie <i>M. tuberculosis</i>	96,59	1.084
Género mycobacterium	92,16	153

Tabla 12. Análisis *in silico* de la reactividad analítica.

La ausencia o bajo número de desajustes encontrados en las secuencias analizadas indica que la detección de las inserciones IS6110 e IS1081, del gen 16S rRNA y de la región de la delección TbD1 no se ve comprometida.

Además, se llevaron a cabo estudios adicionales para analizar la correcta detección de las especies *M. xenopi*, *M. flavescens* y *M. vaccae*. Tras los análisis bioinformáticos y experimentales de las combinaciones de desajustes presentes en cada microorganismo, la conclusión derivada fue que *M. xenopi*, *M. flavescens* y *M. vaccae* pueden detectarse a concentraciones altas en la muestra, pero su detección puede verse comprometida a concentraciones más bajas.

Reactividad analítica: evaluación experimental

La reactividad analítica de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit para las inserciones IS6110 y IS1081 se evaluó frente a DNA procedente de las siguientes cepas de referencia / materiales control, mostrando resultados positivos:

Mycobacterium tuberculosis no resistente a rifampicina
Mycobacterium tuberculosis cepa H37Rv
Mycobacterium tuberculosis cepa X004439
Mycobacterium tuberculosis cepa TMC 331
Mycobacterium bovis cepa AF2122/97
Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG
Mycobacterium bovis cepa BCG
Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG, subcepa Danish 1331
Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG, subcepa Tokyo 172
Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG, subcepa , Russian BCG-I
Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG, subcepa Moreau-RJ
Mycobacterium africanum
Mycobacterium microti
Mycobacterium tuberculosis
 complejo *Mycobacterium tuberculosis*
Mycobacterium tuberculosis resistente a Rifampicina
Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida, Etambutol y estreptomina
Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida
Mycobacterium tuberculosis DR- resistente a Isoniacida
Mycobacterium tuberculosis DR- resistente a Rifampicina
Mycobacterium tuberculosis resistente a Rifampicina e Isoniacida
Mycobacterium tuberculosis resistente a Fluoroquinolona
Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida, Rifampicina, Kanamicina y Fluoroquinolonas
Mycobacterium bovis

La reactividad analítica de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit para el gen 16S rRNA se evaluó frente a DNA procedente de las siguientes cepas de referencia / materiales control, mostrando resultados positivos:

Mycobacterium tuberculosis no resistente a rifampicina
Mycobacterium tuberculosis cepa H37Rv
Mycobacterium tuberculosis cepa X004439
Mycobacterium tuberculosis cepa TMC 331
Mycobacterium bovis cepa AF2122/97
Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG
Mycobacterium bovis cepa BCG
Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG, subcepa Danish 1331
Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG, subcepa Tokyo 172
Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG, subcepa , Russian BCG-I

Mycobacterium bovis cepa Vaccine BCG, subcepa Moreau-RJ

Mycobacterium abscessus

Mycobacterium africanum

M. avium subsp. *avium*, cepa MYCAVI 8058091

M. chelonae

M. goodii cepa CCTM La 587

M. kansasii cepa CCTM La 2401

M. marinum cepa CIP 104528

M. marinum

M. microti

M. peregrinum cepa DSM 43271

M. scrofulaceum

M. smegmatis cepa NCTC 8159

M. smegmatis

M. xenopi Schwabacher cepa TMC 1482 *

Mycobacterium tuberculosis

complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis resistente a Rifampicina

Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida, Etambutol y estreptomina

Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida

Mycobacterium tuberculosis DR- resistente a Isoniacida

Mycobacterium tuberculosis DR- resistente a Rifampicina

Mycobacterium tuberculosis resistente a Rifampicina e Isoniacida

Mycobacterium tuberculosis resistente a Fluoroquinolona

Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida, Rifampicina, Kanamicina y Fluoroquinolonas

M. avium

M. kansasii

complejo *M. avium*

Mycobacterium bovis

* Tenga en cuenta que la detección de *M. xenopi* es dependiente de la concentración a la que se encuentre en la muestra.

La reactividad analítica de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit para la región de la delección TbD1 se evaluó frente a DNA procedente de las siguientes cepas de referencia / materiales control, mostrando resultados positivos:

Mycobacterium tuberculosis no resistente a rifampicina

Mycobacterium tuberculosis cepa H37Rv

Mycobacterium tuberculosis cepa X004439

Mycobacterium tuberculosis cepa TMC 331

Mycobacterium tuberculosis

complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida, Etambutol y estreptomina

Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida

Mycobacterium tuberculosis DR- resistente a Isoniacida

Mycobacterium tuberculosis DR- resistente a Rifampicina

Mycobacterium tuberculosis resistente a Rifampicina e Isoniacida

Mycobacterium tuberculosis resistente a Rifampicina

Mycobacterium tuberculosis resistente a Fluoroquinolona

Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida, Rifampicina, Kanamicina y Fluoroquinolonas

Trazabilidad metrológica

Este dispositivo no está diseñado para fines de medición.

Sensibilidad y especificidad clínica

El funcionamiento clínico de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit fue evaluado utilizando muestras clínicas respiratorias (lavados brocoalveolares, aspirados bronquiales, esputos, colonias obtenidas de esputos, e hisopos nasofaríngeos), de pacientes con sospecha de infección respiratoria. Para ello, se realizaron diferentes evaluaciones multicéntricas en colaboración con entidades nacionales. En las siguientes tablas se muestran algunas características de las evaluaciones y los resultados obtenidos.

Nº	Localización	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1A	Instituto público de Investigación	Colonias obtenidas de muestras de esputo	- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) - CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MTBC MTB NTM
1B		Esputo descontaminado		
2	Evaluación interna	Esputo, aspirados bronquiales, y lavados brocoalveolares	- MagDEA Dx SV Kit/ magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) - LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics)	MTBC MTB NTM
3	Evaluación interna	Hisopos nasofaríngeos y muestras de esputo	- MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit / KingFisher Flex system (Thermo Fisher Scientific) - CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	NTM

Tabla 13. Evaluaciones de Vitassay qPCR MTBC/NTM kit.

Nº	Ensayo Comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV	LR+	LR-
1A	Tipado de RFLP-IS6110 y spoligotyping	NTM	12	38	0	0	1 (0,73-1)	1 (0,90-1)	1 (0,76-1)	1 (0,91-1)	75 (4,76-1180,4)	0,039 (0,003-0,590)
		MTBC	13	37	0	0	1 (0,75-1)	1 (0,90-1)	1 (0,77-1)	1 (0,90-1)	73,28 (4,66-1152,5)	0,036 (0,002-0,551)
		MTB	24	25	0	1	0,96 (0,79-0,99)	1 (0,86-1)	0,96 (0,80-0,99)	1 (0,86-1)	49 (3,143-763,9)	0,059 (0,012-0,278)

1B	Metodología convencional*	NTM	22	91	9	8	0,73 (0,54-0,87)	0,91 (0,83-0,95)	0,73 (0,55-0,85)	0,91 (0,84-0,95)	8,14 (4,21-15,75)	0,293 (0,161-0,532)
		MTBC	50	75	4	1	0,98 (0,89-1)	0,95 (0,87-0,98)	0,98 (0,89-0,99)	0,94 (0,87-0,98)	19,36 (7,44-50,35)	0,021 (0,003-0,144)
		MTB &	47	77	2	4	0,92 (0,81-0,97)	0,97 (0,91-0,99)	0,92 (0,81-0,96)	0,97 (0,91-0,99)	36,40 (9,24-143,34)	0,080 (0,031-0,206)
	Anyplex™ MTB/NTM (Seegene)	NTM	21	98	9	2	0,91 (0,72-0,98)	0,91 (0,84-0,96)	0,92 (0,81-0,97)	0,98 (0,93-0,99)	10,85 (5,73-20,54)	0,095 (0,025-0,357)
		MTBC	52	77	0	1	0,98 (0,89-1)	1 (0,95-1)	0,98 (0,90-0,99)	1 (0,95-1)	151,67 (9,56-2404)	0,028 (0,006-0,135)
		MTB &	47	78	1	1	0,97 (0,88-0,99)	0,98 (0,93-1)	0,97 (0,89-0,99)	0,98 (0,93-0,99)	77,35 (11,02-542,59)	0,021 (0,003-0,147)
2	Diagnóstico de rutina \$	MTBC	2	325	0	0	1 (0,15-1)	1 (0,98 – 1)	1 (0,34-1)	1 (0,99 – 1)	543 (32,53-9074)	0,167 (0,013-2,096)
		NTM	5	322	0	0	1 (0,47-1)	1 (0,98 – 1)	1 (0,65 – 1)	1 (0,99 – 1)	592 (36,73-9546)	0,083 (0,006-1,186)
		MTB	0	327	0	0	n.a.#	1 (0,98 – 1)	n.a.#	1 (0,99 – 1)	n.a.#	n.a.#
3	Secuenciación Sanger	MTBC	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~
		NTM	5	116	0	0	1 (0,47-1)	1 (0,96 – 1)	1 (0,56 – 1)	1 (0,96 – 1)	214,5 (13,355-3445,1)	0,084 (0,006-1,189)
		MTB	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~

Tabla 14. Valores verdaderos positivos (TP) y verdaderos negativos (TN), valores falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), sensibilidad (SE), especificidad (SP), valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) y cociente de verosimilitud (LR) para Vitassay qPCR MTBC/NTM kit.

* Cultivo + observación microscópica (prueba de bacilos acidorresistentes) + INNO-LiPA Mycobacteria (Fujirebio) test + SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid Test (Abbott).

\$ Cultivo + frotis/baciloscopia + confirmación mediante ensayo molecular (Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (Hologic)).

& Debe tenerse en cuenta que las muestras se detectaron como MTBC con Anyplex™ MTB/NTM (Seegene). No se disponía de información sobre el nivel de las especies. Por tanto, se consideraron como falsos positivos debido a la falta de información.

n.a. (no disponible, de sus siglas en inglés): Debido a la falta de resultados verdaderos positivos, no se pudieron calcular los valores de sensibilidad, PPV y LR.

~ n.a. (no disponible, de sus siglas en inglés): Debido a la falta de resultados verdaderos positivos y verdaderos negativos para MTBC y MTB, no se pudieron calcular los valores de sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y LR.

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar el DNA de especies del complejo *M. tuberculosis*, de *Mycobacterium tuberculosis*, y de especies de micobacterias no tuberculosas, utilizando Vitassay qPCR MTBC/NTM kit con colonias clínicas aisladas y muestras de esputo.

Limitaciones

- Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional sanitario, en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas diagnósticas.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de colonias clínicas aisladas de micobacterias y muestras de esputo descontaminado (con resultados positivo o negativo para la prueba de bacilos acidorresistentes (BAAR)). El uso de otras muestras no se ha establecido.
- Aunque este ensayo se podría utilizar con diferentes métodos de extracción/amplificación, sólo se ha validado con los flujos de trabajo mencionados en la sección Flujos de trabajo validados de estas Instrucciones de uso.
- El kit Vitassay qPCR Colour Compensation debe utilizarse para realizar correctamente el análisis con el LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics), ya que está diseñado para generar un archivo de compensación de color en el LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics), como método de calibración para compensar la superposición de la fluorescencia, con el fin de garantizar una interpretación adecuada de los resultados de los ensayos.
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del termociclador si no hay diana que detectar, por lo que es necesario seleccionar solo los canales donde éstas amplifiquen cuando se lleve a cabo la interpretación de resultados.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; los ácidos nucleicos deben ser extraídos 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. No es posible correlacionar los valores Ct obtenidos en la PCR con la concentración de la muestra, ya que éstos dependen del termociclador utilizado y de la propia ejecución.
- En ocasiones se pueden detectar ácidos nucleicos molde diana con un número de copias inferior al límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Tenga en cuenta el rango de medición previsto del ensayo, ya que las muestras con concentraciones por encima o por debajo de este rango pueden dar resultados erróneos.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el control positivo durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de los ácidos nucleicos 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 dar lugar a resultados falsos negativos, entre ellos:
 - (a) Muestreo, envío, almacenamiento y manipulación inadecuados de las muestras.
 - (b) Errores de procedimiento (incluida la extracción de los ácidos nucleicos).
 - (c) Degradación de los ácidos nucleicos durante el envío, almacenamiento y/o preparación de las muestras.
 - (d) La carga del microorganismo esté por debajo del límite de detección del ensayo.
 - (e) Presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el efecto de las vacunas, algunos tratamientos antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o inmunosupresores utilizados para prevenir o durante el tratamiento de la infección. El efecto de sustancias interferentes solo se ha evaluado para aquellas sustancias indicadas en la sección (Interferencias e inhibidores de PCR) de estas Instrucciones de Uso. Por favor, consulte dicha sección para comprobar las sustancias exógenas y endógenas más comunes que inducen una interferencia total o parcial de la reacción qPCR. Otras sustancias no indicadas en este apartado pueden dar lugar a resultados erróneos.
 - (f) Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de cepas nuevas o desconocidas.
 - (g) Incumplimiento de las instrucciones de uso y los procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección de los ácidos nucleicos no implica la presencia de microorganismos viables y/o infecciosos ni que estos microorganismos sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana.
- Los resultados negativos no excluyen la infección por los microorganismos diana, y no deben ser la única base para tomar una decisión sobre el manejo/tratamiento del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos para la identificación de los microorganismos diana y/o la fase de la infección más adecuada para la recolección. Considere la posibilidad de recolectar varios tipos de muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar los microorganismos.

- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con estos microorganismos, y se han descartado otras enfermedades, la posibilidad de un resultado falso negativo no debería desestimarse y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR (incluso siendo el mismo modelo), el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.
- El Control Positivo y el Control Negativo no deben ser extraídos.
- Se recomienda incluir un blanco de muestra durante el proceso de extracción y qPCR para descartar una posible contaminación. Si se omite el blanco de muestra, es posible que no se detecten posibles falsos positivos.
- Es posible que se produzca la detección de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* en el canal ROX si este microorganismo estuviera presente, por lo que podría necesitarse realizar estudios complementarios para descartar falsos positivos para las especies del género mycobacterium. Del mismo modo, la presencia de *Mycoplasma pneumoniae* a concentraciones altas puede apantallar la señal de la especie *M. tuberculosis* (canal Cy5) cuando la concentración de *M. tuberculosis* es cercana al LoD.
- Las dianas se pueden solapar entre diferentes microorganismos para los que se pretende el uso de esta prueba, por lo que las coinfecciones entre ellos pueden ser difíciles de identificar.
- Las especies de micobacterias *M. xenopi*, *M. flavescens* y *M. vaccae* se detectan cuando están presentes a concentraciones elevadas, pero su detección puede verse comprometida a concentraciones más bajas.

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

Reagents provided

In references 7041048 and 7042048:

Reagents provided					
Reference	Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
7041S048/ 7042S048	MTBC/NTM strips low/high profile	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL *	White (opaque)	4 x 8-well strip
		dNTPs	±1 mM *		
		Primers and Probes	0,2-1 nMol/μL *		
		Enzymes	10-100 U/rxn *		
7C048	MTBC/NTM Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	1,9x10 ⁴ copies/μL *	Red	1 vial
7001A	PCR grade water	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	Saline Solution	±13 mM	Green	1 vial x 1,8 mL
		Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
7003N	Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	-	Transparent	4 x 8-cap strip

* For component in stabilized format, the concentration range means after rehydration.

Transport and storage

- Transport and storage of the kits (before use) can be carried out at 2-40°C until the expiry date stated on the label. Once in use, check the storage conditions of each component. The assay should be performed at room temperature. Avoid shaking during transport to prevent leakage of liquids.
- For proper use of the strips, it is recommended not to rehydrate unneeded wells. Unused wells can be easily cut before removing the protective foil and can be stored in the aluminium bags provided with the silica gel inside and closed to avoid contact with light or moisture and stored at 2-40°C for the shelf life indicated on the kit label. Once the wells have been rehydrated, nucleic acid addition and qPCR should be performed immediately.
- The resuspended positive control should be used immediately or stored at -20°C until the expiry date stated on the kit label. The stability of the positive control has been validated after 6 freeze-thaw cycles. However, it is recommended to distribute in aliquots to avoid repeated freeze-thaw cycles.
- Once opened, Resuspension buffer, PCR grade water and Negative Control components should be stored at 2-40°C for the shelf life indicated on the kit label.
- Keep all reagents in the darkness.

- Once the nucleic acid from the sample has been extracted, the eluate can be stored for up to 24 hours at 4°C or 25°C, or for up to one month at -20°C before being added to the qPCR assay.

Material and equipment required, not provided

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and for PCR well-strips or 96-well plates (if available).
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- Blank sample
- Vitassay qPCR Colour Compensation. Only if LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics) is used.

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, the amplification of the insertion sequences IS6110 and IS1081 and the amplification of the TbD1 deletion region. 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 verifies if the amplification reaction works properly. If the PCR reaction is inhibited due to the presence of an artifact/inhibitor or because the well is incorrectly rehydrated this control may become negative.

The detection channels of the target sequences are described as follows:

Target	Detection channel
Insertion sequences IS6110 and IS1081	FAM
16S rRNA	ROX
Internal Control (IC)	HEX* (depending on the equipment used)
TbD1 deletion region	Cy5

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not use the kit without having read and understood the information on procedures, precautions, and limitations provided in the instructions for use.
- 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.
- Use the strips immediately after removing the protective foil to protect the reaction mixture from sunlight. It is not recommended to leave the strips open without resuspending. Once the required wells have been rehydrated, the qPCR assay should be performed immediately.
- It is recommended to cut the required/necessary wells before removing the protective seal from the entire strip. Store the rest inside the bag with the desiccant.

- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (do not remove the desiccant from the pouches). Remove excess air from the bags before sealing.
- Do not use the product near solvents, in order to avoid deterioration of the label/markings.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Rehydrate the vials immediately after opening the Positive Control pouch and use them in the PCR reaction or store them appropriately. Leaving the vial open without resuspending may cause deterioration of the reagent.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area. Once the test is completed wash your hands thoroughly.
- 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.
- 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.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. A new tip should be used for each sample. It is necessary to change gloves before handling the reagents.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- The product **Vitassay qPCR MTBC/NTM** has only been validated with the equipment mentioned in Section Validated workflows of this Instructions for Use.
- You must ensure that the conditions are set up in the thermal cycler according to the instructions in section "Programme your thermocycler".
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), Vitassay qPCR do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- A statement declaring no requirement for Material Safety Data Sheet, and certificate of analysis can be provided on request (not included).
- For additional warnings, precautions and procedures, refer to the manual of the real-time PCR instrument.

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 clinical isolates of mycobacteria and decontaminated sputum (with positive or negative acid-fast bacilli (AFB) test). Other sample types must be validated by the user.

Overall, 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 a biohazard bag 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 ^{4 5}. The samples can be stored at 4°C for up to 24 hours ^{3 4} or frozen at -20°C or lower (at -70°C ideally) for long-term conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

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

- 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).

Note: The conditions for sample collection, transport, and storage indicated above are suggested based on the recommendations for sputum samples intended for use in nucleic acid detection, as outlined in the referenced report of recommendations from the SEIMC for collection and transport in clinical microbiology, and in the IDSA authorised guide referred to above. However, we recommend following the laboratory guidelines and/or the microbiology laboratory policy manual for the proper transport and storage of samples.

Validated workflows

Vitassay qPCR MTBC/NTM has been validated with clinical isolates of mycobacteria and decontaminated sputum (with positive or negative acid-fast bacilli (AFB) test), with the following workflows:

Workflow	Extraction	Analysis
1	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2		LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics)
3		7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)
4	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation with the Vitassay qPCR kits.

For more information regarding the thermal cycler compatibility and most common detection channels contact the manufacturer (info@vitassay.com).

In case of using a different workflow than those mentioned above, the validation of the new workflow shall be performed by the end-user, following the manufacturer's instructions for use.

⁴ 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.

⁵ García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

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.

To improve the handling, performance and quality of bacterial DNA extracted from sputum samples, pretreatment of the sample with acetylcysteine is recommended to facilitate pipetting. For performance evaluation, acetylcysteine 1M was added in proportion 1-1 (volume) to the sample, and the resulting mixture was incubated at 96°C for 10 minutes. If, after this procedure, the sample was not sufficiently liquid for use, more acetylcysteine was added to the sample, increasing the incubation time by 10 minutes.

Please note that Positive and Negative control must not be extracted. However, to monitor or control the extraction process and discard possible contaminations, a blank sample (not provided in the kit) could be extracted following the same procedure used for clinical samples. Blank sample should consist of the same matrix (real or simulated) as clinical samples, previously characterized as negative for all targets.

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized MTBC/NTM Positive Control (red tube) in the 400 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.
- 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 optical caps provided. It is recommended spin down briefly.
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Insertion sequences IS6110 and IS1081), ROX (16S rRNA), Cy5 (TbD1 region) and HEX channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel. For more information regarding the most common detection channels contact the manufacturer (info@vitassay.com).

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is performed 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 signal emission.

For each assay, it is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. To do so, select the well corresponding to the positive control for each channel and set the threshold value within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). In case a threshold is set automatically by the equipment used, check, and verify that it is adjusted to the positive control or adjust it manually. Once the threshold value is set, the test samples can be interpreted.

The chemical nature of the different fluorophores can affect the threshold value of the different channels, just as different signal intensities can influence the threshold value for different instruments.

In addition, it is recommended to include a blank (confirmed negative sample for the detected targets, of the same matrix as the samples tested) to establish the baseline of the assay.

For a valid diagnostic test run, before analysing the result of the clinical samples, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive control used in each run, must show an amplification curve ($C_t \leq 40$) in the channels FAM (IS6110 and IS1081), and Cy5 (TbD1 region), and an amplification curve ($C_t \leq 38$) in the channel ROX (16S rRNA), which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run, must show the signal absence ($C_t > 40$ or no signal) in the channels FAM (IS6110 and IS1081), and Cy5 (TbD1 region), and the signal absence ($C_t > 38$ or no signal) in the channel ROX (16S rRNA), which validates the reaction.

Internal Control (IC) should show an amplification signal ($C_t \leq 40$) in Positive control and Negative control wells, which validates the reaction.

The experiment is invalid if there is no signal in the positive control well for any of the targets or, there is amplification signal in the negative control well, except for the HEX channel which must show amplification (corresponding to the IC). In any of these cases, the test must be repeated.

Once the result of the controls has been validated, for the interpretation of the sample results, **select only the channels where the targets are detected** and with the help of the following table analyse the results:

Sequences IS6110 and IS1081 (FAM)	16S rRNA (ROX)	TbD1 region (Cy5)	Internal Control (HEX)	Interpretation for samples		
				Result	Considerations regarding Ct values	Interpretation
+	+	+	+ ¹	Valid	Ct value FAM < Ct value ROX < Ct value Cy5 ³ [$\Delta Ct_{ROX-FAM}$ and $\Delta Ct_{Cy5-ROX}$ <3]	Positive in <i>M. tuberculosis</i> modern strains.
					Ct value FAM ≤ Ct value ROX < Ct value Cy5 ³ [$\Delta Ct_{ROX-FAM}$ <1 and $\Delta Ct_{Cy5-ROX}$ >3]	Positive in MTBC strains different to <i>M. tuberculosis</i> modern strains + coinfection with <i>M. tuberculosis</i> modern strains.
					Ct value channel ROX < Ct value channels FAM and Cy5 ³	Positive in NTM + coinfection with <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> modern strains.
+	+	-	+ ¹	Valid	Ct value FAM ≈ Ct value ROX ³ [$\Delta Ct_{ROX-FAM}$ ±1]	Positive in MTBC strains different to <i>M. tuberculosis</i> modern strains.
					Ct value FAM > Ct value ROX ³ [$\Delta Ct_{FAM-ROX}$ >1]	Positive in NTM + coinfection with MTBC strains different to <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> modern strains.
+	-	+	+ ¹	Inconclusive	If Ct value FAM > 35 ³	Please repeat the test ⁴ If the result remains the same after the repeat test, the sample should be considered presumptively positive to <i>M. tuberculosis</i> modern strains at concentrations lower than the test's LoD. If the Ct value in ROX ≤40, the sample should be considered positive to <i>M. tuberculosis</i> modern strains.
					Ct value FAM < 35 ³	Please repeat the test ⁴
+	-	-	+ ¹	Inconclusive	Ct value FAM > 35 ³	Please repeat the test ⁴ If the result remains the same after the repeat test, the sample should be considered presumptively positive to <i>M. tuberculosis</i> modern strains or to MTBC strains different to <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> modern strains, at concentrations lower than the test's LoD. If the Ct value in ROX ≤40, the sample should be considered positive to MTBC strains different to <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> modern strains.
					Ct value FAM < 35 ³	Please repeat the test ⁴
-	+ [†]	+	+ ¹	Invalid	-	Please repeat the test ⁴
-	+ [†]	-	+ ¹	Valid	-	Positive in NTM
-	-	+	+ ¹	Invalid	-	Please repeat the test ⁴
-	-	-	+ ²	Valid	-	Targets not detected ²
-	-	-	- ²	Invalid	-	Test failed ²

MTBC = *M. tuberculosis* complex strains; NTM = non-tuberculous mycobacteria.

For IS6110 and IS1081 sequences - TbD1 Region –Internal Control**Positive (+):** Amplification signal (Ct ≤40) except for ²**Negative (-):** No amplification signal (Ct >40 or no signal) except for ²**For 16S rRNA****Positive (+):** Amplification signal (Ct ≤38)**Negative (-):** No amplification signal (Ct >38 or no signal)

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

¹ The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40). Sometimes, the Internal Control (IC) detection does not occur since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids. In this case, the reaction is considered “Invalid” and it is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 following laboratory guidelines and/or microbiology laboratory policy manuals.

² In the event that the detection of target genes is negative, 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, following laboratory guidelines and/or microbiology laboratory policy manuals.

³ Only the whole number value of Ct will be taken into consideration. If the Ct value given by the PCR equipment has decimals, it will need to be rounded to the nearest whole number.

⁴ In the event of an unclear result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used, 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 (obtain a new specimen and re-extract and retest, re-extract and retest another aliquot of the same specimen or repeat qPCR with the same isolated DNA sample).

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**Analytical linearity**

The analytical linearity was determined by testing serial dilutions (1:10) of a known concentration (10^7 to 10^1 copies per reaction) of specific and synthetic DNA belonging to the target genes to detect strains of the *M. tuberculosis* complex, the genus mycobacterium, and the species *M. tuberculosis*. Below is an example of the amplification plot resulting from an assay run on the CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

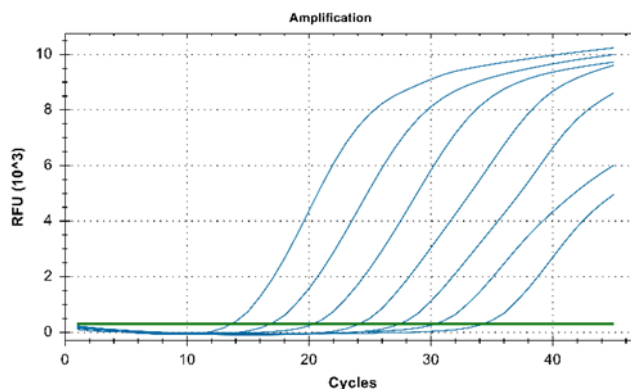


Figure 4. Experiment with serial dilutions of an DNA standard of insertion sequences IS6110 and IS1081 performed on the CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).

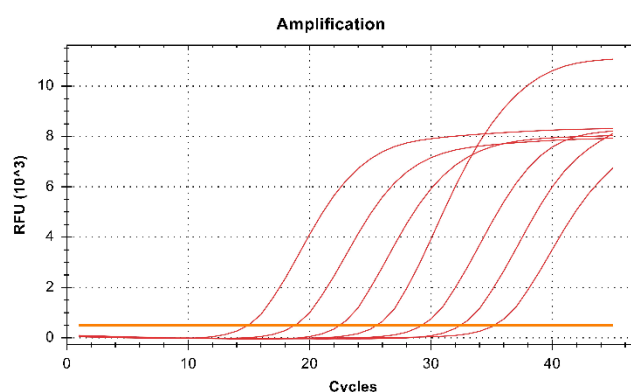


Figure 5. Experiment with serial dilutions of an DNA standard of 16S rRNA gene performed on the CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel ROX).

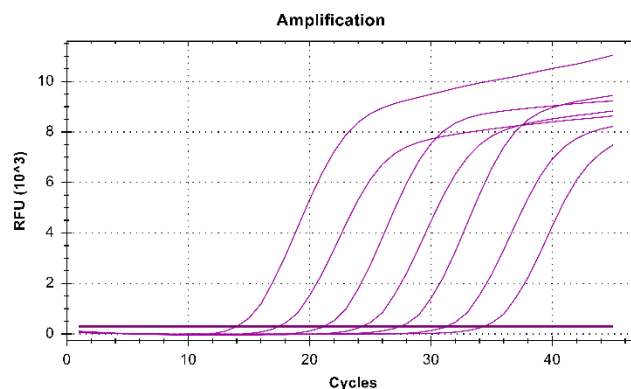


Figure 6. Experiment with serial dilutions of an DNA standard of the TbD1 deletion region performed on the CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel Cy5).

Linearity was also determined by analysing the same dilutions with the LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics), and 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), and the same level of detection was observed as that obtained with the CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) across the entire range studied.

Analytical sensitivity. Limit of Detection (LoD)

Analytical sensitivity or limit of detection (LoD) of Vitassay qPCR MTBC/NTM was analysed using isolated clinical colonies of mycobacteria, and sputum samples. Samples were extracted and analysed using the workflows mentioned in Section [Validated workflows](#) of these Instructions. Vitassay qPCR MTBC/NTM showed a detection limit indicated in the following table, with a positive rate of $\geq 95\%$.

LOD						
Workflow	<i>M. tuberculosis</i> strain H37Rv		<i>M. bovis</i> (BCG)		<i>M. smegmatis</i> strain mc2155	
	Isolated clinical colonies	Sputum	Isolated clinical colonies	Sputum	Isolated clinical colonies	Sputum
1	0,2 CFU/rxn (0,02 CFU/ μ L)	1,6 CFU/rxn (0,16 CFU/ μ L)	32 CFU/rxn (3,2 CFU/ μ L)	50 CFU/rxn (5 CFU/ μ L)	10 CFU/rxn (1 CFU/ μ L)	40 CFU/rxn (4 CFU/ μ L)
2	0,4 CFU/rxn (0,04 CFU/ μ L)	1,6 CFU/rxn (0,16 CFU/ μ L)	16 CFU/rxn (1,6 CFU/ μ L)	100 CFU/rxn (10 CFU/ μ L)	20 CFU/rxn (2 CFU/ μ L)	80 CFU/rxn (8 CFU/ μ L)
3	0,4 CFU/rxn (0,04 CFU/ μ L)	0,8 CFU/rxn (0,08 CFU/ μ L)	16 CFU/rxn (1,6 CFU/ μ L)	50 CFU/rxn (5 CFU/ μ L)	20 CFU/rxn (2 CFU/ μ L)	80 CFU/rxn (8 CFU/ μ L)
4	0,4 CFU/rxn (0,04 CFU/ μ L)	0,8 CFU/rxn (0,08 CFU/ μ L)	32 CFU/rxn (3,2 CFU/ μ L)	100 CFU/rxn (10 CFU/ μ L)	20 CFU/rxn (2 CFU/ μ L)	40 CFU/rxn (4 CFU/ μ L)

Table 15. LoD results of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit, using the validated workflows with isolated clinical colonies, and sputum samples contaminated with reference material for species of the *M. tuberculosis* complex, the genus mycobacterium, and the species *M. tuberculosis*. CFU = Colony-forming units, rxn = reaction.

Measuring range

The measuring range of the assay was determined by testing a series of ten-fold dilutions containing a known concentration of specific and synthetic DNA belonging to the target genes to detect strains of the *M. tuberculosis* complex, the genus mycobacterium, and the species *M. tuberculosis*, and refined with LoD experiments. Results allowed to confirm the correct detection of the targets at the measuring range indicated in the following table:

Measuring range (copies/reaction)		
Target IS6110 and IS1081 sequences	10 ⁹	10
Target 16S rRNA gene	10 ⁹	1,60
Target TbD1 deletion region	10 ⁹	1,27

Table 16. Measuring range of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit.

In conclusion, the measuring range of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit was successfully determined according to the acceptance validation criteria initially stated, ensuring reliable, accurate and reproducible results across a wide spectrum of microbial loads, affirming its utility in various clinical diagnostic scenarios.

Accuracy

Trueness (Veracity)

The veracity of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit was evaluated by testing the reference material listed below. In the case of reference DNA, they were analysed with the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

1. The American Type Culture Collection (“ATCC®”):

- *Mycobacterium bovis* Strain AF 2122/97 (Ref. BAA-935D-2)
- *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv (Ref. 25618D)
- *Mycobacterium tuberculosis* Strain TMC 331 (Ref. 35838D-2)
- *Mycobacterium tuberculosis* Strain X004439 (Ref. BAA-2236D-2)
- *Mycobacterium africanum* (Ref. 25420DQ)
- *Mycobacterium microti* (Ref. 19422DQ)
- *Mycobacterium xenopi* Schwabacher Strain TMC 1482 (Ref. 19250)

The reference strains of the *M. tuberculosis* complex from the ATCC, were extracted (where applicable) with MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and analysed with the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

2. Spanish Collection of Type Cultures (CECT):

- *Mycobacterium abscessus* HCUV-356153 (Ref. 8517)
- *Mycobacterium avium subsp. avium* MYCAVI 8058091 (Ref. 7407)
- *Mycobacterium gordonae* CCTM La 587 (Ref. 3029)
- *Mycobacterium kansasii* CCTM La 2401 (Ref. 3030)
- *Mycobacterium marinum* CIP 104528 (Ref. 7091)
- *Mycobacterium peregrinum* DSM 43271 (Ref. 3023)
- *Mycobacterium smegmatis* NCTC 8159 (Ref. 3020)

Reference strains of non-tuberculous mycobacteria from the CECT, were analysed with the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

3. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC):

- BCG Danish 1331 sub-strain (Ref. 07/270)
- BCG Tokyo 172 sub-strain (Ref. 07/272)
- BCG Russian BCG-I sub-strain (Ref. 07/274)
- BCG Moreau-RJ sub-strain (Ref. 10/272)

The reference strains of the *M. tuberculosis* complex from the NIBSC, were extracted with the MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and analysed with the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

4. Characterised clinical colonies:

- *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
- *Mycobacterium bovis* Vaccine BCG
- *Mycobacterium smegmatis* Strain mc2155
- *Mycobacterium chelonae*
- *Mycobacterium fortuitum*
- *Mycobacterium marinum*
- *Mycobacterium scrofulaceum*

The characterised clinical colonies of the *M. tuberculosis* complex, the species *M. tuberculosis*, and non-tuberculous mycobacteria, were extracted with MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and analysed with CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Precision

To determine the precision of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit, intra-assay (repeatability), inter-assay (reproducibility), inter-batch and inter-thermocycler assays were performed. The panel of samples was extracted with the MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and analysed with the thermocycler indicated in each section. In each run, both a positive and a negative control were included.

Intra-assay

The intra-assay was tested by analysing replicates of all samples in the same run using Vitassay qPCR MTBC/NTM kit and the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The following table shows the results obtained in this assay.

Sample	Target	Channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positive 1 (6xLoD)	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	29,51	0,27	0,91
	16S rRNA gene	ROX	30,96	0,36	1,15
	TbD1 deletion region	Cy5	32,48	0,22	0,69
Positive 2 (3xLoD)	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	31,19	0,27	0,86
	16S rRNA gene	ROX	33,07	0,6	1,10
	TbD1 deletion region	Cy5	34,20	0,80	2,35
Negative Sample	IS6110 and IS1081 insertions 16S rRNA gene TbD1 deletion region	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	22,08	0,12	0,53
Positive Control	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	21,50	0,07	0,32
	16S rRNA gene	ROX	19,80	0,05	0,25
	TbD1 deletion region	Cy5	21,05	0,02	0,09
Negative Control	IS6110 and IS1081 insertions 16S rRNA gene TbD1 deletion region	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	22,60	0,14	0,60

Table 17. Intra-assay results of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, NA = not applicable.

Inter-assay

The inter-assay was tested by analysing replicates of the different samples on three different days by three different operators with the Vitassay qPCR MTBC/NTM kit, using the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). A summary of results is shown in the table below.

Sample	Target	Channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positive 1 (6xLoD)	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	29,69	0,53	1,78
	16S rRNA gene	ROX	32,19	0,79	2,44
	TbD1 deletion region	Cy5	32,50	0,28	0,86
Positive 2 (3xLoD)	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	31,49	0,51	1,62
	16S rRNA gene	ROX	33,94	0,83	2,45
	TbD1 deletion region	Cy5	34,64	0,40	1,16
Negative Sample	IS6110 and IS1081 insertions 16S rRNA gene TbD1 deletion region	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	22,21	0,28	1,26

Positive Control	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	21,86	0,37	1,71
	16S rRNA gene	ROX	20,94	0,58	2,77
	TbD1 deletion region	Cy5	21,47	0,34	1,57
Negative Control	IS6110 and IS1081 insertions 16S rRNA gene TbD1 deletion region	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	22,12	0,32	1,46

Table 18. Inter-assay results of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, NA = not applicable.

Inter-batch

The inter-batch values were determined analysing replicates of the different samples by using three batches of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit run on CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The results are described in the following table.

Sample	Target	Channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positive 1 (6xLoD)	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	29,29	0,20	0,70
	16S rRNA gene	ROX	31,67	0,26	0,82
	TbD1 deletion region	Cy5	32,94	0,60	1,83
Positive 2 (3xLoD)	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	31,18	0,19	0,61
	16S rRNA gene	ROX	33,63	0,45	1,35
	TbD1 deletion region	Cy5	35,13	0,53	1,50
Negative Sample	IS6110 and IS1081 insertions 16S rRNA gene TbD1 deletion region	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	23,93	0,89	3,73
Positive Control	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	21,68	0,27	1,26
	16S rRNA gene	ROX	21,06	0,37	1,78
	TbD1 deletion region	Cy5	21,89	0,27	1,23
Negative Control	IS6110 and IS1081 insertions 16S rRNA gene TbD1 deletion region	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	22,97	0,63	2,75

Table 19. Inter-batch results of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, NA = not applicable.

Inter-thermocycler

The inter-thermocycler values were determined with replicates of the same samples used for intra-assay, inter-assay and inter-batch assays, using the Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. The DNA extracted from samples, and positive, and negative controls were tested all together in the same run, on CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics) and 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). The results are described in the following table.

Sample	Target	Channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positive 1 (6xLoD)	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	29,34	0,25	0,87
	16S rRNA gene	ROX	32,26	0,96	2,99
	TbD1 deletion region	Cy5	33,16	0,57	1,72
Positive 2 (3xLoD)	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	31,63	0,58	1,85
	16S rRNA gene	ROX	34,59	1,69	4,89
	TbD1 deletion region	Cy5	35,33	0,53	1,51
Negative Sample	IS6110 and IS1081 insertions 16S rRNA gene TbD1 deletion region	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	23,36	0,71	3,05
Positive Control	IS6110 and IS1081 insertions	FAM	21,82	0,54	2,46
	16S rRNA gene	ROX	21,16	0,51	2,41
	TbD1 deletion region	Cy5	22,14	0,51	2,32
Negative Control	IS6110 and IS1081 insertions 16S rRNA gene TbD1 deletion region	FAM/ROX/Cy5	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	22,02	1,46	6,61

Table 20. Inter-thermocycler results of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, NA = not applicable.

Analytical specificity and reactivity

The analytical specificity and analytical reactivity were evaluated for the Vitassay qPCR MTBC/NTM kit *in silico* and experimentally using different starting material such as certified reference strains, certified reference RNA/DNAs and material from the EQAs programmes.

Analytical specificity

Analytical specificity is the assay's ability to detect the intended target. There are two components to be considered for analytical specificity: Cross-reactivity and Interference. Cross-reactivity may occur when genetically related sequences are present in a patient specimen, while interference may happen if the presence of specific substances potentially present in the sample matrixes affects the performance of the qPCR.

Cross-reactivity: *in silico* analysis

The cross-reactivity was assessed by using reference sequences of microorganisms from NCBI GenBank, and an internal bioinformatic analysis software. A BLAST analysis was performed on each primer and probe in the NCBI Genbank Nucleotide database, as well as an internal bioinformatic analysis. Sequences aligned with an alignment percentage lower than 80% of homology were considered unlikely to be detected. The results shown refer to sequences with a homology percentage greater than 80%.

All sequences analysed with the primer and probe set for the *M. tuberculosis* complex and for the species *M. tuberculosis* showed a percentage of homology lower than 80%.

Regarding the set of primers and probe for detecting sequences of the genus mycobacterium, a sequence with homology greater than 80% was found: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (Ref. NZ_JIAH01000003.1) with a homology percentage of 95,08%.

To check for possible detection of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, a complementary analysis was carried out with 2.704 sequences of *C. pseudodiphtheriticum* from NCBI GenBank database. As a result of the analysis, 79 sequences were detected, showing a homology of the 95,08% with the 16S rRNA gene.

Therefore, the Vitassay designs for the targets of the *M. tuberculosis* complex, non-tuberculous mycobacteria, and the *M. tuberculosis* species, should result in correct detection, bearing in mind that *C. pseudodiphtheriticum* could also be detected as a mycobacterium member.

Analytical specificity: wet testing

Cross-reactivity: wet testing

The cross-reactivity of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit was confirmed by testing a panel of different microorganisms associated with respiratory diseases with which most of the population has been infected, or flora present in the respiratory tract. Where possible, and where concentration data were available, the microorganisms were evaluated at medically relevant levels (generally 10^5 - 10^6 cfu/mL for bacteria and 10^4 - 10^5 pfu/mL for viruses).

Cross-reactivity was observed with *C. pseudodiphtheriticum* in channel ROX (used for detecting the target of the genus mycobacterium), in accordance with the *in-silico* studies. This microorganism may be present as part of the commensal flora of the respiratory tract, but it has been shown to be clinically relevant when cultured from samples taken from the lower respiratory tract of symptomatic patients⁶. No cross-reactions were detected with any of the other microorganisms tested, except for the target microorganisms detected by the assay.

Cross-reactivity assay			
Adenovirus type 1	-	Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1); Influenza B/Florida/04/06	-
Adenovirus type 2 strain Adenoid 6	-	<i>Legionella bozemanii</i> serovar 1	-
Adenovirus type 3 strain GB	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Adenovirus type 4 strain RI-67	-	<i>Legionella longbeache</i>	-
Adenovirus type 5	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
Adenovirus type 8	-	<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1	-
Adenovirus type 15 strain CH.38	-	Human metapneumovirus A1	-
Adenovirus type 31 strain 1315/63 (NIAID V-231-001-014)	-	Human metapneumovirus A2	-
Adenovirus type 40 strain Dugan	-	Human metapneumovirus B2	-
Adenovirus type 41 strain Tak (73-3544)	-	MERS Coronavirus	-
Bocavirus	-	<i>Moraxella catharralis</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Mycobacterium abscessus</i>	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain HCUV-356153	-/+

⁶ Van Roeden, S. E., Thijsen, S. F., Sankatsing, S. U. C., & Limonard, G. J. M. (2015). Clinical relevance of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in lower respiratory tract specimens. *Infectious Diseases*, 47(12), 862–868.

Cross-reactivity assay			
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Mycobacterium africanum</i>	-/+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Mycobacterium avium</i>	-/+
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> , strain MYCAVI 8058091	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotype A	-	<i>Mycobacterium avium</i> complex	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotype C	-	<i>Mycobacterium bovis</i>	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> strain CM-1	-	<i>Mycobacterium bovis</i> strain AF2122/97	-/+
Coronavirus strains HKU1, NL63, OC43 and 229E	-	<i>Mycobacterium bovis</i> strain BCG	-/+
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> strain 153	-/+*	<i>Mycobacterium bovis</i> strain BCG, Danish 1331 sub-strain	-/+
Enterovirus Coxsackievirus A9, A24 and B3	-	<i>Mycobacterium bovis</i> strain BCG, Moreau-RJ sub-strain	-/+
Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Mycobacterium bovis</i> strain BCG, Russian BCG-I sub-strain	-/+
Enterovirus types 68 and 71	-	<i>Mycobacterium bovis</i> strain BCG, Tokyo 172 sub-strain	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> strain Minn A	-	<i>Mycobacterium bovis</i> strain vaccine BCG	-/+
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Mycobacterium chelonae</i>	-/+
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus (vaccine strain)	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-/+
Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus	-	<i>Mycobacterium gordonae</i> strain CCTM La 587	-/+
Seasonal Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus (vaccine strain)	-	<i>Mycobacterium kansasii</i>	-/+
Seasonal Influenza A/Thüringen/5/2017 (Clade 3C2a.1) (patient isolate)	-	<i>Mycobacterium kansasii</i> strain CCTM La 2401	-/+
Strain similar to Influenza A/California/7/2009 (H1N1): (NYMC X-179A); Influenza A/Perth/16/2009 (H3N2) (NYMC X-187) (A/Victoria/210/2009); Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Mycobacterium marinum</i>	-/+
Influenza A/California/7/2009 (H1N1)pdm09: (NYMC X-179A); strain similar to Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), (A/South Australia/55/2014, IVR-175); Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Mycobacterium marinum</i> strain CIP 104528	-/+
Strain similar to Influenza A/Michigan/45/2015(H1N1) pdm09 (Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180); strain similar to Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) (Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B); Influenza B/Brisbane/60/2008, wild type	-	<i>Mycobacterium microti</i>	-/+

Cross-reactivity assay			
<i>Mycobacterium peregrinum</i> strain DSM 43271	-/+	<i>Mycobacterium smegmatis</i> strain NCTC 8159	-/+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-/+	<i>Mycobacterium xenopi</i> strain TMC 1482 **	-/+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	-/+	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> DR- resistant to Isoniazid	-/+	<i>Neisseria sicca</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> DR- and resistant to rifampicin	-/+	Parainfluenza virus types 1, 2, 3, 4	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistant to Isoniazid, Ethambutol and streptomycin	-/+	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistant to rifampicin	-/+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> non-resistant to rifampicin	-/+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistant to isoniazid	-/+	Rhinovirus type C	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistant to rifampicin and Isoniazid	-/+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistant to Fluoroquinolone	-/+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistant to Isoniazid, Rifampicin, Kanamycin and Fluoroquinolones	-/+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	-/+	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> strain TMC 331	-/+	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> strain X004439	-/+	Respiratory Syncytial Virus Types A and B	-
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	-/+	SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-/+		

Table 21. Reference microorganisms used in this study.

* Cross-reactivity was observed with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in channel ROX (used for detecting the target of the genus mycobacterium).

** Please note that the detection of *M. xenopi* depends on the concentration found in the sample.

In addition, Vitassay qPCR MTBC/NTM kit was tested with high concentrations of a selection of different microorganisms associated with respiratory diseases, together with the presence of all the targets detected by the Vitassay kit at a concentration close to the LoD, to verify that the presence of other related respiratory microorganisms will not interfere with the detection of the targets identified with the Vitassay kit. The results obtained showed that only the presence of *M. pneumoniae* at high concentrations would affect the detection of the *M. tuberculosis* species (channel Cy5 is affected) at a concentration close to the LoD when the Vitassay qPCR MTBC/NTM kit is used.

Cross-reactivity assay			
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> strain CM-1	+	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> (Designation: Philadelphia 1)	+
<i>Haemophilus influenzae</i> Designation: Rd [KW20]	+	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> [Sp264]	+
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Designation: Spain 23F1 [Sp264]	+

Table 22. Reference microorganisms tested in the presence of a quantified strain, for all targets detected with the Vitassay kit.

Analysis of co-infection

A co-infection analysis was performed primarily to assess the potential difficulties in identifying co-infections when two of the target microorganisms are present. To do this, a matrix verified as negative was contaminated (sputum) with different concentrations (5xLoD, 50xLoD and 5000xLoD) of various combinations of a modern strain of *M. tuberculosis*, a strain of the *M. tuberculosis* complex, and a representative strain of non-tuberculous mycobacteria. Samples were extracted with MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and were analysed using the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The results are shown in the following table:

Sample number	IS6110 and IS1081 (FAM)		16S rRNA gene (ROX)		TbD1 deletion region (Cy5)		Average of the differences in Ct values	
	Average Ct	SD	Average Ct	SD	Average Ct	SD	$\Delta Ct_{ROX-FAM}$	$\Delta Ct_{Cy5-ROX}$
1	29,84	0,42	31,84	0,74	33,41	0,36	2,01	1,57
2	26,37	0,37	28,27	0,10	30,14	0,15	1,90	1,87
3	32,81	0,33	31,95	0,36	-	-	-0,85	-
4	29,11	0,24	28,14	0,13	-	-	-0,97	-
5	-	-	35,52	0,96	-	-	-	-
6	-	-	31,42	0,28	-	-	-	-
7	29,17	0,21	31,20	0,22	33,05	0,32	2,03	1,85
8	26,23	0,17	27,83	0,13	30,04	0,05	1,60	2,21
9	28,26	0,38	28,76	0,26	33,10	0,06	0,50	4,33
10	26,08	0,36	28,50	0,11	29,66	0,12	2,42	1,16
11	29,47	0,33	31,86	0,35	33,43	0,43	2,39	1,57
12	26,11	0,46	28,38	0,07	29,81	0,09	2,27	1,43
13	29,84	0,29	30,15	0,19	33,16	0,24	0,31	3,01
14	26,21	0,09	28,66	0,13	29,91	0,16	2,46	1,25
15	32,44	0,36	32,22	0,38	-	-	-0,23	-
16	29,33	0,20	28,56	0,07	-	-	-0,77	-
17	32,66	0,34	30,31	0,25	-	-	-2,35	-
18	29,23	0,10	28,96	0,14	-	-	-0,27	-
19	21,49	0,24	21,31	0,14	33,15	0,32	-0,18	11,85
20	19,18	0,06	21,30	0,17	22,48	0,13	2,12	1,18
21	29,57	0,46	23,74	0,22	32,95	0,19	-5,83	9,21
22	19,28	0,21	21,73	0,22	22,84	0,17	2,45	1,11
23	33,10	0,22	23,99	0,27	-	-	-9,10	-
24	21,41	0,24	21,29	0,13	-	-	-0,12	-

Table 23. Ct values obtained in the co-infection analysis test for Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. Ct = threshold cycle, SD = Standard Deviation, $\Delta Ct_{ROX-FAM}$ = Ct value ROX –Ct value FAM; $\Delta Ct_{Cy5-ROX}$ = Ct value Cy5 –Ct value ROX.

Considering the targets that should show amplification signals for each type of microorganism (as shown in section “Analysis and interpretation of results” of this Instructions), the possibilities of co-infection that are difficult to assess could be:

- Coinfection of *M. tuberculosis* modern strains + other members of *M. tuberculosis* complex versus *M. tuberculosis* modern strains → there would be amplification in the three detection channels.
- Coinfection of *M. tuberculosis* modern strains + non-tuberculous mycobacteria versus *M. tuberculosis* modern strains → there would be amplification in the three detection channels.
- Coinfection with other members of *M. tuberculosis* complex + non-tuberculous mycobacteria versus other members of *M. tuberculosis* complex → the identification targets of the *M. tuberculosis* complex and of the genus mycobacterium would show amplification.

Overall, the results showed that the presence of members of the *M. tuberculosis* complex (MTBC) different to *M. tuberculosis* modern strains coinfecting with lower amounts of *M. tuberculosis* modern strains, as well as the presence of non-tuberculous mycobacteria (NTM) coinfecting with lower amounts of *M. tuberculosis* modern strains or MTBC different to *M. tuberculosis* modern strains, considering the differences observed in Ct values between channels. For the Interpretation of results of this Instructions, a range of these differences in Ct values between channels has been considered.

Interferences and PCR inhibitors

A study of interfering substances was conducted to test the possible interference effect of endogenous and exogenous substances on Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. In total, 23 potentially interfering substances have been evaluated. Samples were extracted using MagDEA Dx SV Kit together with the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and amplified with the thermocycler CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). As test control, the rehydrated reaction mixture without any added interfering substance was used, subsequently adding the nucleic acid extracted from the simulated sample (Positive Matrix Control (PMC)). In addition, as Negative Matrix Control (NMC), the negative matrix without potentially interfering substances and without added microorganisms/reference material was also tested.

Evaluation of the interference in qPCR assay alone

The following results were obtained when potentially interfering substance was added directly to the rehydrated master mix, which also contains the nucleic acid previously extracted from the simulated samples:

Substance	Concentration tested	Result
NMC	-	N.I
PMC	-	N.I
Acetaminophen / Paracetamol (dolocatil)	0,156 mg/mL	N.I
Albumin	10 mg/mL	N.I
Albuterol sulphate (salbutamol)	4,5 x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Amoxicillin	8,40x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Benzocaine	0,75 mg/mL	N.I
Dextromethorphan	1,56 x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Erythromycin	0,138 mg/mL	N.I
Ethambutol	0,03 mg/mL	N.I
Fluticasone	1,26 x10 ⁻⁶ mg/mL	N.I
Genomic DNA	3,5 x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Isoniazid	6,00x10 ⁻² mg/mL	N.I
Mucin	2,5 mg/mL	N.I
Mupirocin	1,50x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Nicotine	7,5x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Oxymetazoline hydrochloride	0,1 mg/mL	N.I
Phenylephrine	3x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Rifampicin	1,20x10 ⁻² mg/mL	N.I
Sodium chloride	0,9 mg/mL	N.I
Sulfamethoxazole	0,28 mg/mL	N.I
Tobramycin	0,033 mg/mL	N.I
Triglycerides	15 mg/mL	N.I
Trimethoprim	4,20x10 ⁻² mg/mL	N.I
Whole blood	0,25 % (v/v)	N.I

Table 24. Potentially interfering substances. N.I: Non-reportable interference. v/v = volume/volume relation. NMC = negative matrix control, PMC = positive matrix control.

Evaluation of the interference in the whole process (extraction and the qPCR)

The following results were obtained when potentially interfering substances were added to the simulated sample that was going to be extracted, from which the obtained eluate was added to the qPCR assay:

Substance	Concentration tested	Result
NMC	-	N.I
PMC	-	N.I
Acetaminophen / Paracetamol (dolocatil)	0,156 mg/mL	N.I
Albumin	10 mg/mL	N.I
Albuterol Sulphate (salbutamol)	4,5 x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Amoxicillin	2,1x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Benzocaine	3 mg/mL	N.I
Dextromethorphan	1,56 x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Erythromycin	0,138 mg/mL	N.I
Ethambutol	0,03 mg/mL	N.I
Fluticasone	1,26 x10 ⁻⁶ mg/mL	N.I
Genomic DNA	3,5 x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Isoniazid	1,5x10 ⁻² mg/mL	N.I
Mucin	2,5 mg/mL	N.I
Mupirocin	1,50x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Nicotine	3,00x10 ⁻² mg/mL	N.I
Oxymetazoline hydrochloride	0,1 mg/mL	N.I
Phenylephrine	3x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I
Rifampicin	4,8x10 ⁻² mg/mL	N.I
Sodium chloride	0,9 mg/mL	N.I
Sulfamethoxazole	1,12 mg/mL	N.I
Tobramycin	0,033 mg/mL	N.I
Triglycerides	15 mg/mL	N.I
Trimethoprim	4,20x10 ⁻² mg/mL	N.I
Whole blood	1 % (v/v)	N.I

Table 25. Potentially interfering substances. N.I: Non-reportable interference. v/v = volume/volume relation. NMC = negative matrix control, PMC = positive matrix control.

In conclusion, different potentially interfering substances, both endogenous and exogenous, were evaluated with Vitassay qPCR MTBC/NTM kit. The results obtained lead to conclude that, at the concentrations tested, no interference of any the evaluated substances is observed at the concentrations indicated for each condition.

Analytical reactivity

Analytical reactivity can be defined as the percentage of target microbial strains or DNA/RNA samples that give the correct positive result. Analytical reactivity was studied *in silico* and by wet analyses.

Analytical reactivity: *in silico* analysis

Analytical reactivity was evaluated using sequences of microorganisms from NCBI GenBank, and internal bioinformatic analysis software, to demonstrate that target sequences can be correctly detected by the device under study.

The *in-silico* analysis of the primer and probe designs was performed by alignment against the sequences available in the NCBI GenBank database, using an internal bioinformatic analysis software. The results obtained are shown in the following table:

Target	% sequences detected without mismatches	N° sequences
<i>M. tuberculosis</i> complex strains	100	201
<i>M. tuberculosis</i> Specie	96,59	1.084
Mycobacterium genus	92,16	153

Table 26. Analytical Reactivity *in-silico* assay.

The absence or low number of mismatches found in the sequences analysed indicates that the detection of insertions IS6110 and IS1081, 16S rRNA gene and TbD1 deletion region is not compromised.

In addition, additional studies were carried out to analyse the correct detection of the species *M. xenopi*, *M. flavescens* and *M. vaccae*. Following bioinformatic and experimental analyses of the combinations of mismatches present in each microorganism, the conclusion was that *M. xenopi*, *M. flavescens* and *M. vaccae* may be detected at high concentrations in the sample, but their detection may be compromised at lower concentrations.

Analytical reactivity: wet testing

The analytical reactivity of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit for insertions IS6110 and IS1081 was evaluated against the DNA from the following reference strains / control materials, showing positive results:

Mycobacterium tuberculosis non-resistant to rifampicin

Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv

Mycobacterium tuberculosis strain X004439

Mycobacterium tuberculosis strain TMC 331

Mycobacterium bovis strain AF2122/97

Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG

Mycobacterium bovis strain BCG

Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG, sub-strain Danish 1331

Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG, sub-strain Tokyo 172

Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG, sub-strain , Russian BCG-I

Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG, sub-strain Moreau-RJ

Mycobacterium africanum

Mycobacterium microti

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis complex

Mycobacterium tuberculosis resistant to Rifampicin

Mycobacterium tuberculosis resistant to Isoniazid, Ethambutol and streptomycin

Mycobacterium tuberculosis resistant to Isoniazid

Mycobacterium tuberculosis DR- resistant to Isoniazid

Mycobacterium tuberculosis DR- resistant to Rifampicin

Mycobacterium tuberculosis resistant to Rifampicin and Isoniazid

Mycobacterium tuberculosis resistant to Fluoroquinolone

Mycobacterium tuberculosis resistant to Isoniazid, Rifampicin, Kanamycin and Fluoroquinolones

Mycobacterium bovis

The analytical reactivity of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit for 16S rRNA gene was evaluated against the DNA from the following reference strains / control materials, showing positive results:

Mycobacterium tuberculosis non-resistant to rifampicin
Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv
Mycobacterium tuberculosis strain X004439
Mycobacterium tuberculosis strain TMC 331
Mycobacterium bovis strain AF2122/97
Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG
Mycobacterium bovis strain BCG
Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG, sub-strain Danish 1331
Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG, sub-strain Tokyo 172
Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG, sub-strain , Russian BCG-I
Mycobacterium bovis strain Vaccine BCG, sub-strain Moreau-RJ
Mycobacterium abscessus
Mycobacterium africanum
M. avium subsp. *avium*, strain MYCAVI 8058091
M. chelonae
M. goodii strain CCTM La 587
M. kansasii strain CCTM La 2401
M. marinum strain CIP 104528
M. marinum
M. microti
M. peregrinum strain DSM 43271
M. scrofulaceum
M. smegmatis strain NCTC 8159
M. smegmatis
M. xenopi Schwabacher strain TMC 1482 *
Mycobacterium tuberculosis
Mycobacterium tuberculosis complex
Mycobacterium tuberculosis resistant to Rifampicin
Mycobacterium tuberculosis resistant to Isoniazid, Ethambutol and streptomycin
Mycobacterium tuberculosis resistant to Isoniazid
Mycobacterium tuberculosis DR- resistant to Isoniazid
Mycobacterium tuberculosis DR- resistant to Rifampicin
Mycobacterium tuberculosis resistant to Rifampicin and Isoniazid
Mycobacterium tuberculosis resistant to Fluoroquinolone
Mycobacterium tuberculosis resistant to Isoniazid, Rifampicin, Kanamycin and Fluoroquinolones
M. avium
M. kansasii

M. avium complex

Mycobacterium bovis

* Please note that the detection of *M. xenopi* depends on the concentration found in the sample.

The analytical reactivity of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit for TbD1 deletion region was evaluated against DNA from the following reference strains / control materials, showing positive results:

Mycobacterium tuberculosis non-resistant to rifampicin

Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv

Mycobacterium tuberculosis strain X004439

Mycobacterium tuberculosis strain TMC 331

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis complex

Mycobacterium tuberculosis resistant to Isoniazid, Ethambutol and streptomycin

Mycobacterium tuberculosis resistant to Isoniazid

Mycobacterium tuberculosis DR- resistant to Isoniazid

Mycobacterium tuberculosis DR- resistant to Rifampicin

Mycobacterium tuberculosis resistant to Rifampicin and Isoniazid

Mycobacterium tuberculosis resistant to Rifampicin

Mycobacterium tuberculosis resistant to Fluoroquinolone

Mycobacterium tuberculosis resistant to Isoniazid, Rifampicin, Kanamycin and Fluoroquinolones

Metrological traceability

This assay is not designed for measuring purposes.

Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of Vitassay qPCR MTBC/NTM kit was tested using respiratory clinical samples (bronchoalveolar lavages, bronchial aspirates, sputum, colonies obtained from sputum, and nasopharyngeal swabs), from patients with suspected respiratory infection. To this end, different multicentre evaluations were conducted through collaboration with national entities. The following tables show some characteristics of the evaluations, and the results obtained.

Nº	Site	Sample Type	Workflow	Target
1A	Public research institute	Colonies obtained from sputum samples	- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) - CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MTBC MTB NTM
1B		Decontaminated sputum		
2	Internal evaluation	Sputum, bronchial aspirates and bronchoalveolar lavages	- MagDEA Dx SV Kit/ magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) - LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics)	MTBC MTB NTM

3	Internal evaluation	Nasopharyngeal swabs and sputum samples	- MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit / KingFisher Flex system (Thermo Fisher Scientific) - CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	NTM
---	---------------------	---	---	-----

Table 27. Vitassay qPCR MTBC/NTM kit evaluations.

Nº	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV	LR+	LR-
1A	Typing of RFLP-IS6110 and spoligotyping	NTM	12	38	0	0	1 (0,73-1)	1 (0,90-1)	1 (0,76-1)	1 (0,91-1)	75 (4,76-1180,4)	0,039 (0,003-0,590)
		MTBC	13	37	0	0	1 (0,75-1)	1 (0,90-1)	1 (0,77-1)	1 (0,90-1)	73,28 (4,66-1152,5)	0,036 (0,002-0,551)
		MTB	24	25	0	1	0,96 (0,79-0,99)	1 (0,86-1)	0,96 (0,80-0,99)	1 (0,86-1)	49 (3,143-763,9)	0,059 (0,012-0,278)
1B	Conventional methodology*	NTM	22	91	9	8	0,73 (0,54-0,87)	0,91 (0,83-0,95)	0,73 (0,55-0,85)	0,91 (0,84-0,95)	8,14 (4,21-15,75)	0,293 (0,161-0,532)
		MTBC	50	75	4	1	0,98 (0,89-1)	0,95 (0,87-0,98)	0,98 (0,89-0,99)	0,94 (0,87-0,98)	19,36 (7,44-50,35)	0,021 (0,003-0,144)
		MTB &	47	77	2	4	0,92 (0,81-0,97)	0,97 (0,91-0,99)	0,92 (0,81-0,96)	0,97 (0,91-0,99)	36,40 (9,24-143,34)	0,080 (0,031-0,206)
	Anyplex™ MTB/NTM (Seegene)	NTM	21	98	9	2	0,91 (0,72-0,98)	0,91 (0,84-0,96)	0,92 (0,81-0,97)	0,98 (0,93-0,99)	10,85 (5,73-20,54)	0,095 (0,025-0,357)
		MTBC	52	77	0	1	0,98 (0,89-1)	1 (0,95-1)	0,98 (0,90-0,99)	1 (0,95-1)	151,67 (9,56-2404)	0,028 (0,006-0,135)
		MTB &	47	78	1	1	0,97 (0,88-0,99)	0,98 (0,93-1)	0,97 (0,89-0,99)	0,98 (0,93-0,99)	77,35 (11,02-542,59)	0,021 (0,003-0,147)
2	Routine diagnosis \$	MTBC	2	325	0	0	1 (0,15-1)	1 (0,98 – 1)	1 (0,34-1)	1 (0,99 – 1)	543 (32,53-9074)	0,167 (0,013-2,096)
		NTM	5	322	0	0	1 (0,47-1)	1 (0,98 – 1)	1 (0,65 – 1)	1 (0,99 – 1)	592 (36,73-9546)	0,083 (0,006-1,186)
		MTB	0	327	0	0	n.a.#	1 (0,98 – 1)	n.a.#	1 (0,99 – 1)	n.a.#	n.a.#
3	Sanger sequencing	MTBC	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~
		NTM	5	116	0	0	1 (0,47-1)	1 (0,96 – 1)	1 (0,56 – 1)	1 (0,96 – 1)	214,5 (13,355-3445,1)	0,084 (0,006-1,189)
		MTB	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~	n.a.~

Table 28. True positive (TP) and true negative (TN) values, false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity (SE), specificity (SP), Positive Predictive Values (PPV), Negative Predictive Values (NPV) and the likelihood ratios (LR) for Vitassay qPCR MTBC/NTM kit.

* Culture + microscopic observation (acid-resistant bacilli test) + INNO-LiPA Mycobacteria (Fujirebio) test + SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid Test (Abbott).

\$ Culture + smear/microscopy for bacilli + confirmation by molecular testing (Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (Hologic)).

& It should be noted that the samples were detected as MTBC with Anyplex™ MTB/NTM (Seegene). No information was available on the level of the species. Therefore, they were considered false positives due to lack of information.

n.a. (not available): Due to the lack of true positive results, it was not possible to calculate the values of sensitivity, PPV and LR.

~ n.a. (not available): Due to the lack of true positive and true negative results for MTBC and MTB, the values of sensitivity, specificity, PPV, NPV and LR could not be calculated.

These results show a high degree of concordance for detecting the DNA of species of the *M. tuberculosis* complex, of *Mycobacterium tuberculosis*, and of non-tuberculous mycobacteria species, using Vitassay qPCR MTBC/NTM kit with isolated clinical colonies and sputum samples.

Limitations

- Test results should be evaluated by a healthcare professional in the context of the medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- This assay has been validated with DNA extracted from isolated clinical colonies of mycobacteria and decontaminated sputum (with positive or negative result for acid-fast bacilli (AFB) test). The use of other samples has not been established.
- Although this assay can be used with other nucleic acid extraction/amplification methods, it was validated only with the workflows mentioned in section Validated workflows of this Instructions for use.
- The Vitassay qPCR Colour Compensation kit must be used to correctly perform the analysis with the LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics) due to it is designed for generating a Colour Compensation File on the LightCycler® 480 Instrument II (Roche Molecular Diagnostics) as a calibration method to compensate the bleed-over fluorescence to guarantee a proper interpretation of the assays results.
- Possible crosstalk might be observed in empty channels of the thermocycler if there is no target to be detected, so it is required to select only the channels where these are amplified when interpretation of results is performed.
- Proper performance of the test depends on the quality of the sample; nucleic acids must be properly extracted from clinical specimens.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test. It is not possible to correlate the Ct values obtained by PCR with the concentration of the sample as they depend on the thermal cycler used and the run itself.
- Occasionally, target template nucleic acids with a copy number below the limit of detection can be detected, but the results may not be reproducible.
- Please note the intended measurement range of the assay, as samples with concentrations above or below this range may give erroneous results.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination with different microorganisms, either by the positive control during reconstitution, by samples containing high concentrations of the target template nucleic acids, or by carryover contamination from PCR products of previous reactions.
- Detection can be affected by several factors and their combinations that can lead to false negative results, including:
 - (a) Inadequate sampling, shipping, storage and handling of samples;
 - (b) Procedural errors (including extraction of nucleic acids);
 - (c) Degradation of nucleic acids during shipping, storage and/or preparation of samples;
 - (d) The load of the microorganism is below the detection limit of the assay;
 - (e) Presence of real-time amplification inhibitors or other types of interfering substances. The effect of vaccines, some antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent or during treatment of infection have not been evaluated. The effect of interfering substances has only been evaluated for those indicated in section (Interferences and inhibitors of PCR) of this Instructions for Use. Please, see this section to check the most common endogenous and exogenous substances that induce a total or partial interference of qPCR reaction. Other substances not indicated in this part could lead to erroneous results.
 - (f) Mutations or

polymorphisms in primer or probe binding regions may affect the detection of new or unknown strains. (g) Non-compliance with the instructions of use and procedures suggested by the manufacturer.

- Detection of nucleic acids does not imply the presence of viable and/or infectious microorganisms or that these microorganisms are the causative agents of clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targeted sequences.
- Negative results do not preclude infection by the target microorganisms and should not be the sole basis for a patient management/treatment decision. The optimal specimen types for identification of the target microorganisms and/or the stage of infection best suited for collection have not yet been established. Consider collecting multiple types of specimens from the same patient at different times, which may increase the likelihood of detecting the microorganisms.
- If the patient's clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible infection by these microorganisms, and other diseases have been discarded, a false negative result might not be dismissed, and additional tests should be performed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment (even being the same model), extraction system, sample type, and pretreatment, among others.
- Positive Control and Negative Control should not be extracted.
- It is recommended to include a blank sample during the extraction and qPCR process to rule out possible contamination. If blank sample is omitted, potential false positive results might remain undetected.
- Detection of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* may occur in channel ROX if this microorganism were present, so further studies may be needed to rule out false positives for species of the genus mycobacterium. Similarly, the presence of *Mycoplasma pneumoniae* at high concentrations can shield the signal from *M. tuberculosis* species (channel Cy5) when the concentration of *M. tuberculosis* is close to the LoD.
- Targets may overlap between different microorganisms for which this test is intended to be used, making co-infections between them difficult to identify.
- Mycobacterial species *M. xenopi*, *M. flavescens* and *M. vaccae* are detected when present in high concentrations, but their detection may be compromised at lower concentrations.

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/Marcas registradas

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

Todas las marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a sus respectivos propietarios.

Symbols for components and reagents / Símbolos para reactivos y productos

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>Producto para diagnóstico in vitro</i>		Contains sufficient for <n> test <i>Contiene <n> test</i>		Catalogue number <i>Número de referencia</i>		Keep dry <i>Almacenar en lugar seco</i>		Manufacturer <i>Fabricante</i>
	Consult instructions for use <i>Consultar las instrucciones de uso</i>		Batch code <i>Número de lote</i>		Use by <i>Fecha de caducidad</i>		Temperature limitation <i>Limitación de temperatura</i>		Volume <i>Volumen</i>
	CE marking <i>Marcado CE</i>								

Change Control / Control de cambios		
Version N° / Versión N°	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original versión / <i>Versión original</i>	05/2020
01	General update (extraction kits, compatible thermocyclers, technical specifications, etc.). Error correction. Adjustment of Ct value range. Data update / <i>Actualización general (kits de extracción, termocicladores compatibles, datos características técnicas, etc). Corrección errores. Ajuste del rango de los valores de Ct. Actualización de datos.</i>	05/2022
02	New format, editorial improvement and better explanation of some sections, more information regarding material, reagents, transport and conservation, addition of some precautions, clarifications, and recommendations, addition section Validated workflows, Positive control rehydration procedure update, Interpretation of results and technical characteristics update, inclusion of new limitations, deletion of Compatibles PCR equipment section and Attached I, II and III, addition of symbols not covered / <i>Nuevo formato, mejora de la redacción y mejor explicación de algunas secciones, más información sobre el material, los reactivos, el transporte y la conservación, adición de algunas precauciones, aclaraciones y, recomendaciones, adicción sección flujos de trabajo validados, actualización del procedimiento de rehidratación de control positivo, Actualización de la Interpretación de resultados y de las características técnicas, inclusión de nuevas limitaciones, supresión de la sección Termocicladores compatibles y de los Anexos I, II y III, adición de símbolos no contemplados.</i>	05/11/2025

Real-Time PCR Kits



identifying pathogens worldwide

Vitassay Healthcare, S.L.U

Parque Tecnológico Walqa

Ctra. N-330 Km. 566

22197 Huesca (Spain)

Ph. (+34) 974 001 193

info@vitassay.com

www.vitassay.com

F09-81 Rev.01