

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

M. tuberculosis complex

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MTC106L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MTC106H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MTC112L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MTC112H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MTC113L
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MTC113H
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC136
VIASURE <i>M. tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MTC172



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit is designed for specific detection of *M. tuberculosis* complex species in respiratory samples from patients with signs and symptoms of Tuberculosis infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the Tuberculosis in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from specimens, multiplied using real time amplification and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *M. tuberculosis* complex strains.

2. Summary and Explanation

Tuberculosis is a contagious, chronic and granulomatous disease caused by *M. tuberculosis*. This disease was declared in 1993 as a "global health emergency" due to its magnitude as a public health problem. Infection occurs through the inhalation of aerosols that contain the pathogen and are transmitted by people with active pulmonary tuberculosis. After inhalation, the bacteria deposit in the alveoli and spread through the lymphatic circulation. Further dissemination to other parts of the lung and occasionally to other organs is achieved through hematogenous circulation. The most common form of the disease is pulmonary tuberculosis, although tuberculous meningitis, miliary tuberculosis (disseminated), intestinal tuberculosis, lymphadenitis, osteomyelitis and Pott's disease (affected bones) also occur. Primary infection leads to active disease in approximately 10% of infected people and in 80% of cases in the period of two years. In the remaining 90%, the immune system controls the infection and the individual is not infectious or asymptomatic. It is estimated that one third of the world population has latent tuberculosis; that is, these people are infected with the bacillus, but (still) have not become ill or can transmit the infection. In this clinical state, TB bacilli can remain inactive for years (latent TB). However, when the immune system weakens, the latent infection can be reactivated. In a person infected with HIV, the risk of reactivation of latent TB is more than 10% per year, compared to a lifetime risk of 10-20% for HIV negative people.

When the active form of the disease occurs, the symptoms (cough, fever, night sweats, weight loss, etc.) can be mild for many months. As a result, patients sometimes take time to seek medical attention and transmit the bacteria to others. Over a year, a tubercular patient can infect 10 to 15 people through close contact. If they do not receive the appropriate treatment, up to two thirds of the tubercular patients die.

The application of molecular techniques for diagnosis and typing, more sensitive, specific and quick than traditional tests, allow to improve the knowledge of the epidemiology of the infection and facilitate decisions for its control.

3. Principle of the procedure

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of Tuberculosis caused by *M. tuberculosis* complex strains in clinical samples. After DNA isolation, the detection of *M. tuberculosis* complex strains is performed by the amplification of regions of the insertion sequence IS6110 and IS1081 using specific primers and fluorescent-labeled probes.



VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. The Insertion sequences IS6110 and IS1081 are amplified and detected in FAM channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1, 2 and 3. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices (See Annex 1). Table 3 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis complex</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>M. tuberculosis complex</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTC106L, VS-MTC106H, VS-MTC112L and VS-MTC112H.



Reagent/Material	Description	Color	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>M. tuberculosis</i> complex Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTC113L and VS-MTC113H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>M. tuberculosis</i> complex 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent	9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>M. tuberculosis</i> complex Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	9/18 X 4-cap strip

Table 3. Reagents and materials provided in VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MTC136 and VS-MTC172. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with and Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-



Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is indented for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-MTC113L, VS-MTC113H, VS-MTC136 and VS-MTC172). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-MTC136 and VS-MTC172 (compatible with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.



- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of extraction kit used.

For DNA extraction from clinical samples (sputums, BAL and others) you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions for use. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).

8.2. Lyophilized positive control

M. tuberculosis complex Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *M. tuberculosis complex* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *M. tuberculosis complex* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the plate or the strips in the thermocycler.



3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

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

Table 5. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Insertion sequences IS6110 and IS1081) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *M. tuberculosis complex* in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer’s instructions.

Using the following table read and analyze the results:

Insertion sequences IS6110 and IS1081 (FAM)	Internal control (HEX)	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+/-	-	+	<i>M. tuberculosis complex strains Positive</i>
-	+	-	+	<i>M. tuberculosis complex strains Negative</i>
+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	Experiment fail

Table 6. Sample interpretation

+: Amplification curve

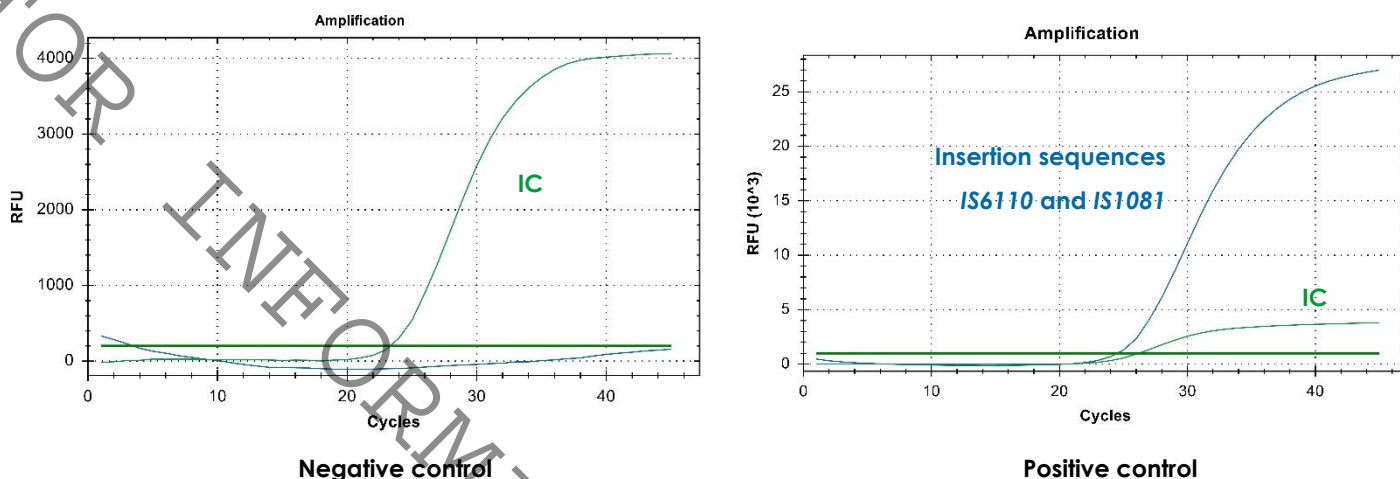
-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids



A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with DNA extracted from sputum and BAL samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *M. tuberculosis* complex Positive Control either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.



11. Quality control

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit was tested using 70 positive DNAs (MTBC and NTM strains) from clinical samples (sputums and BAL) from symptomatic patients. The obtained results were compared with those obtained using traditional culture and characterized by conventional PCR follow by sequencing.

Selected samples were positive to MTBC and NTM species and the strain distribution of sublineages was as follow: L2 sublineage Beijing, L4 Euro-American sublineages T, Haarlem, LAM, X and *Mycobacterium africanum* L5 and L6. In addition, 5 DNAs belong to NTM species (*M. avium*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* and *M. abscessus*).

The results were as follows:

VIASURE <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit	PCR conventional and sequencing		
	+	-	Total
+	65	0	65
-	0	5	5
Total	65	5	70

Table 7. Comparative results.

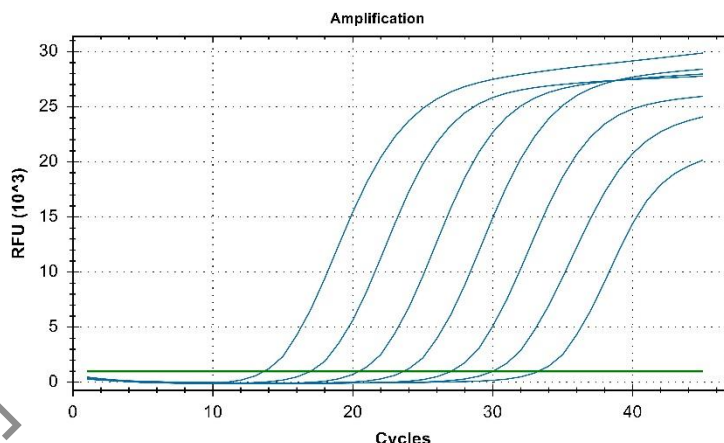
The results show a high sensitivity and specificity to detect *M. tuberculosis complex* using VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction (Figure 2).



Figure 2. Dilution series of Insertion sequences IS6110 and IS1081 (10⁷-10¹ copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *M. tuberculosis* complex assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-	Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella longbeache</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-	Human rhinovirus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	Human Adenovirus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Respiratory Syncytial virus (RSV A and RSV B)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus (H5N8) virus	-	Human Bocavirus	-
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reihenrente/AR8444/2016 (H5N8) virus	-	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	-	<i>Mycobacterium marinum</i>	-	<i>Mycobacterium kansasii</i>	-
<i>Mycobacterium abscessus</i>	-	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	-	<i>Mycobacterium gordonae</i>	-

Table 8. Reference pathogenic microorganisms used in this study.



12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum* and *Mycobacterium microti* strains showing positive results.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".
 (2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.
 (3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.
 (4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.
 (5) No detection in Cy5 channel.
 (6) Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

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



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección específica de las especies pertenecientes al complejo de *M. tuberculosis* en muestras respiratorias de pacientes con signos y síntomas de infección por Tuberculosis. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *M. tuberculosis* combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído de las muestras respiratorias, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher) para detectar las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*.

2. Introducción y explicación

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa, crónica y granulomatosa causada por *M. tuberculosis*. Esta enfermedad fue declarada en 1993 como una "emergencia sanitaria mundial" debido a su magnitud como problema de salud pública. La infección ocurre a través de la inhalación de aerosoles que contienen el patógeno y son transmitidos por personas con tuberculosis pulmonar activa. Después de la inhalación, las bacterias se depositan en los alveolos y se diseminan por la circulación linfática. La diseminación adicional a otras partes del pulmón y ocasionalmente a otros órganos se logra mediante la circulación hematogena. La forma más común de la enfermedad es la tuberculosis pulmonar, aunque también se presentan meningitis tuberculosa, tuberculosis miliar (diseminada), tuberculosis intestinal, linfadenitis, osteomielitis y enfermedad de Pott (huesos afectados). La infección primaria conduce a la enfermedad activa en aproximadamente el 10% de las personas infectadas y en el 80% de los casos en el período de dos años. En el 90% restante, el sistema inmune controla la infección y el individuo no es infeccioso ni asintomático. Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, esas personas están infectadas por el bacilo, pero (aún) no han enfermado ni pueden transmitir la infección. En este estado clínico, los bacilos de TB pueden permanecer inactivos durante años (TB latente). Sin embargo, cuando el sistema inmunitario se debilita, la infección latente puede reactivarse. En una persona infectada por el VIH, el riesgo de reactivación de la TB latente es más de 10% por año, en comparación con un riesgo de por vida de 10-20% para las personas VIH negativas.

Cuando la forma activa de la enfermedad se presenta, los síntomas (tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, etcétera) pueden ser leves durante muchos meses. Como resultado de ello, en ocasiones los pacientes tardan en buscar atención médica y transmiten la bacteria a otras personas. A lo largo de un año, un enfermo tuberculoso puede infectar a unas 10 a 15 personas por contacto estrecho. Si no reciben el tratamiento adecuado, hasta dos terceras partes de los enfermos tuberculosos mueren.

La aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico y tipificación, más sensibles, específicas y rápidas que las pruebas tradicionales, permiten mejorar el conocimiento de la epidemiología de la infección y facilitar las decisiones para su control.



3. Procedimiento

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de la Tuberculosis causada por cepas pertenecientes al complejo de *M. tuberculosis* en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *M. tuberculosis* se realiza mediante la amplificación de una región de las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (oligonucleótidos / sondas específicas, dNTPS, tampón, polimerasa) en un formato estabilizado, así como un control interno para monitorear la inhibición de la PCR. Las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 se amplifican y detectan en el canal FAM y el control interno (IC) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado, consulte el Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *M. tuberculosis* complex Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>M. tuberculosis complex</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC106L, VS-MTC106H, VS-MTC112L y VS-MTC112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>M. tuberculosis complex</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC113L y VS-MTC113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>M. tuberculosis complex</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>M. tuberculosis complex</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MTC136 y VS-MTC172. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).



5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
 - Vórtex.
 - Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
 - Puntas con filtro.
 - Guantes desechables sin polvo.
 - Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.



- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-MTC113L, VS-MTC113H, VS-MTC136 y VS-MTC172). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
 - No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
 - No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
 - Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencias VS-MTC136 y VS-MTC172 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir muestras de clínicas (esputos, BAL), puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- MagDEA Dx SV kit, empleando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.)



8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *M. tuberculosis complex* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *M. tuberculosis complex* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *M. tuberculosis complex* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla 5. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador



Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *M. tuberculosis complex*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 (FAM)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Cepas <i>M. tuberculosis complex</i> Positivas
-	+	-	+	Cepas <i>M. tuberculosis complex</i> Negativas
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

Tabla 6. Interpretación

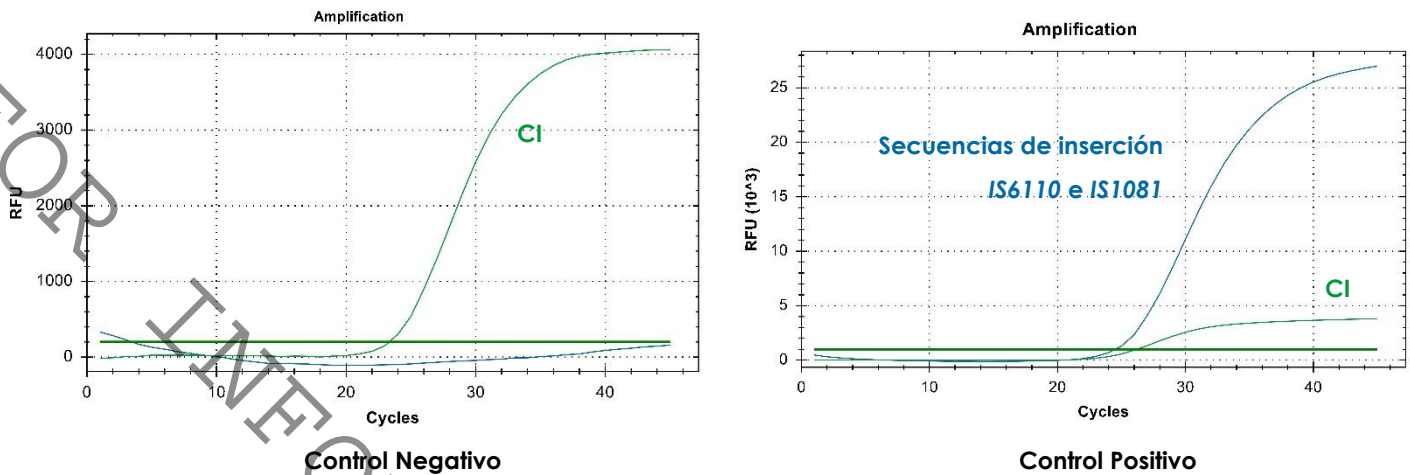
+: curva de amplificación
-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.



Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con esputos y con BAL.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *M. tuberculosis complex* ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.



11. Control de calidad

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con 70 DNAs positivos (cepas MTBC y NTM) de muestras clínicas (esputos y BAL) de pacientes sintomáticos. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos mediante el cultivo tradicional y se caracterizaron por PCR convencional seguido por secuenciación.

Las muestras seleccionadas fueron positivas para las especies MTBC y NTM y la distribución de la cepa de sublinajes fue la siguiente: sublinaje L2 de Beijing, sublinajes L4 euro-americanos, Haarlem, LAM, X y *Mycobacterium africanum* L5 y L6. Además, 5 ADN pertenecen a especies NTM (*M. avium*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* y *M. abscessus*).

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> Real Time PCR Detection Kit	PCR convencional y secuenciación		
	+	-	Total
+	65	0	65
-	0	5	5
Total	65	5	70

Table 7. Comparativa de resultados.

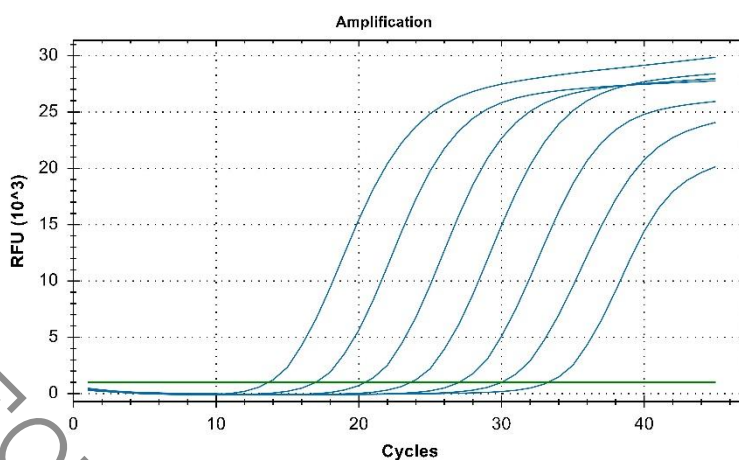
Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *M. tuberculosis complex* utilizando VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción. (Figura 2).



Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *M. tuberculosis complex* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-	Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella longbeache</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-	Human rhinovirus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	Human Adenovirus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Respiratory Syncytial virus (RSV A y RSV B)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus (H5N8) virus	-	Human Bocavirus	-
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus	-	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	-	<i>Mycobacterium marinum</i>	-	<i>Mycobacterium kansasii</i>	-
<i>Mycobacterium abscessus</i>	-	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	-	<i>Mycobacterium gordonae</i>	-

Tabla 8. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *M. tuberculosis complex* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a las cepas *Mycobacterium bovis* AF 2122/97, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* TMC 331, *Mycobacterium tuberculosis* X004439, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti* mostrando un resultado positiva.











13. Bibliography/Bibliografía

1. Selim *et al.* Duplex real-time PCR assay targeting insertion elements IS1081 and IS6110 for detection of *Mycobacterium bovis* in lymph nodes of cattle. *Biotechnology in Animal Husbandry* 30 (1), p 45-59, 2014.
2. Jesús Gonzalo-Asensio *et al.* New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its Dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* Complex lineages. *Plos Genetics*, 14(4) April 2018.
3. Ramadass Balamurugan *et al.* PCR Amplification of the IS6110 Insertion Element of *Mycobacterium tuberculosis* in Fecal Samples from Patients with Intestinal Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006 May; 44(5): 1884–1886.
4. Paul H.M. Savelkoul *et al.*, Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with Real Time PCR: Comparison of different prime-probe sets base on the IS6110 element. *Journal of Microbiological Methods*. Volume 66, Issue 1, July 2006, Pages 177-180
5. L.A.S. Lira *et al.* Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples of patients with pulmonary TB. *Journal of Applied Microbiology* 2012.
6. Francesco Broccolo *et al.* Rapid Diagnosis of Mycobacterial Infections and Quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* Load by two real-time calibrated PCR assays. *Journal of clinical microbiology*. Oct. 2003, p.4565-4572.
7. Santos FCF *et al.* Performance of the IS6110-TaqMan assay in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis from different biological samples. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 51 (3):331-337, may-june, 2018.
8. Dilia Fontalvo Rivera y Doris Gómez Camargo. Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Revista Médicas UIS*. 2015;28 (1):39-51.
9. I. Dorronsoro y L. Torroba. Microbiología de la tuberculosis. *An. Sist. Navar.* 2007 Vol 30, Suplemento 2.
10. Fernando Alcaide Fernández de Vega. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Control Calidad SEIMC*.
11. Bergmann JS, Keating WE, Woods GL. Clinical evaluation of the BDProbe Tc ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38:863-865.
12. Gianna M. *et al.*, Evaluation of the BDProbeTc ET System for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary and Extrapulmonary Samples: a Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology*. Apr. 2003, p. 1779-1782.
13. Gülnur Tarhan. Molecular Diagnostic Test Used in the Diagnosis of Tuberculosis. *Cohesive Journal of Microbiology and Infectious Disease*.
14. Emilia Cercenado y Rafael Cantón. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 9ª. *Micobacterias*.



15. <https://www.tbfacts.org/tb-tests/>
16. Onno W. Akkerman *et al.* Comparison of 14 molecular assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Nov; 51(11): 3505–3511.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

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



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	583/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: March 2019

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.cerTEST.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC