

MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT (Ref: RTPCR016-LP Y RTPCR016-LPD)

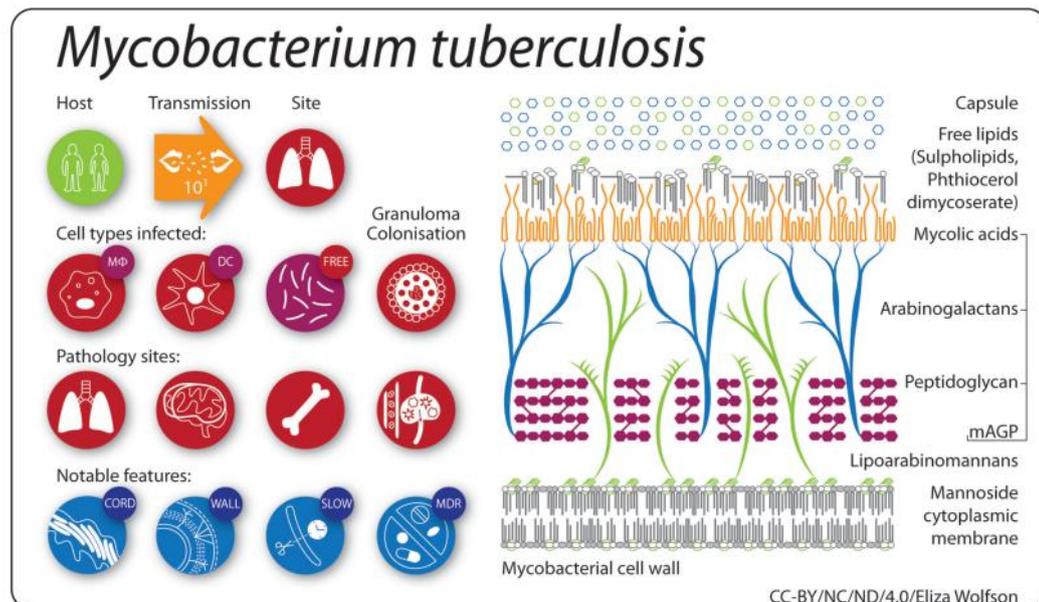
Introducción

La tuberculosis (TB) es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo descubierto por Robert Koch en 1882. Este hecho, todavía hoy, se sigue considerando como un importante hito en la historia de la medicina.

Mycobacterium tuberculosis causa tuberculosis tanto en humanos como en animales.

Se encuentran presentes en el suelo, el agua y animales.

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo aeróbico (bacteria en forma de bastón) de crecimiento lento, quimio-organotrófico, inmóvil, no formador de esporas, con un tamaño de 0,2-0,6 µm de ancho y 1,0-10 µm de largo.

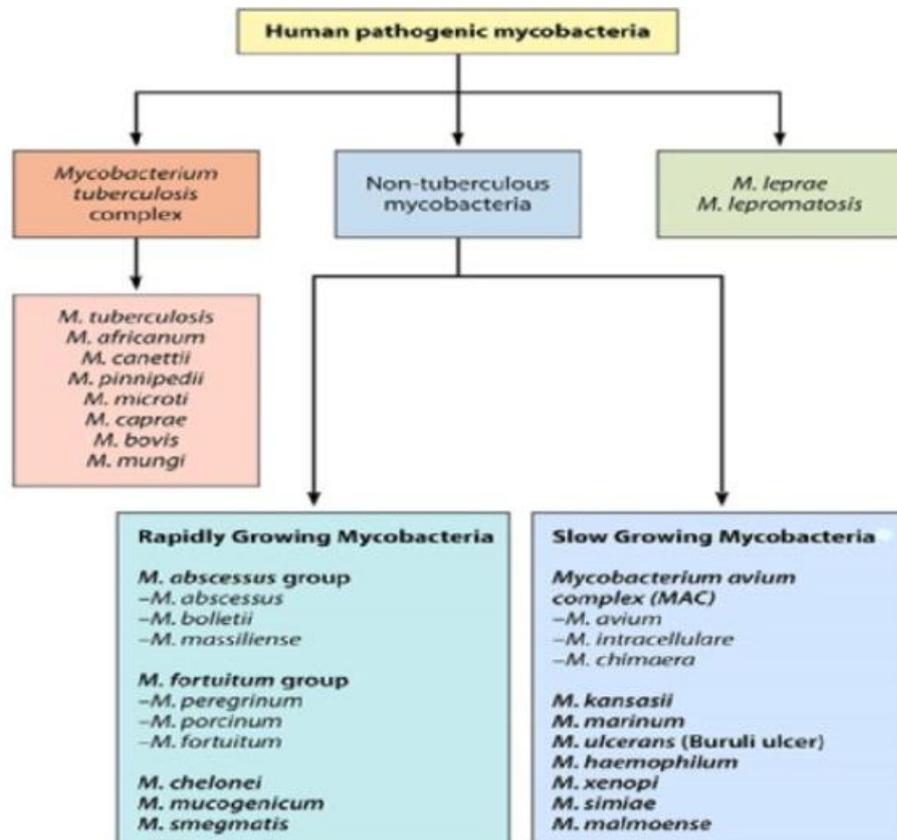


MΦ: macrófago; DC: Célula dendrítica; CORD: Factor cuerda; MDR: "Multidrug-resistance"

La pared celular de *M. tuberculosis* es característica de las micobacterias; tiene una estructura similar a la de las bacterias gramnegativas con una "segunda membrana externa" que contiene los ácidos micólicos. Este muro hace que *M. tuberculosis* tenga una relativa impermeabilidad a los antibióticos. El factor cuerda (dimicolato de trehalosa) es esencial para la virulencia de *M. tuberculosis* y es responsable del su crecimiento característico en cultivo formando cordones largos en forma de serpiente. No obstante, la elaborada pared celular del bacilo es su talón de Aquiles del bacilo, ya que su síntesis es el objetivo de varios fármacos antituberculosos de primera línea como la isoniazida, el etambutol o la etionamida.

Dependiendo de la capacidad de las *micobacterias* para producir la enfermedad tuberculosa, se clasifican en:

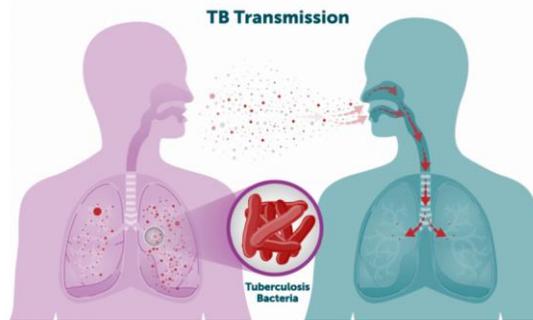
- Micobacterias tuberculosas: Debido al *complejo M. Tuberculosis*. Existen diferentes especies dentro de este complejo causantes de una enfermedad granulomatosa crónica que afecta principalmente a los pulmones.
- Micobacterias no tuberculosas (NTM): Debido a complejos no tuberculosos como el complejo *Mycobacterium avium* (MAC), o el complejo *Mycobacterium abscessus* (MABSC) entre otros.



La enfermedad se propaga cuando las personas enfermas de tuberculosis expulsan bacterias al aire, por ejemplo, al toser, estornudar o escupir. Aunque generalmente afecta a los pulmones (tuberculosis pulmonar), también puede comprometer a otros órganos como el riñón, la columna vertebral o el cerebro (tuberculosis extrapulmonar). La mayoría de las personas que desarrollan la enfermedad (alrededor del 90%) son adultos, siendo más frecuentes en la población masculina que en la femenina.

No todas las personas que están en contacto con una persona con la enfermedad de tuberculosis infecciosa se contagian. Hay cuatro factores que determinan la probabilidad de transmisión de la bacteria:

- **Susceptibilidad** (estado inmunológico) del individuo expuesto.
- **Infecciosidad** de la persona con enfermedad de tuberculosis, que está directamente relacionada con el número de bacilos tuberculosos que expulsan al aire.
- **Factores ambientales** (como el espacio, la ventilación, la circulación, etc.) que afectan la concentración de bacterias de la tuberculosis en el aire.
- **Factores de exposición**, como la duración, la frecuencia y la proximidad física a la persona con enfermedad de tuberculosis



Se estima que alrededor de una cuarta parte de la población mundial ha sido infectada con *M. tuberculosis*. Después de la infección, el riesgo de desarrollar la enfermedad de tuberculosis es más alto en los primeros 2 años (aproximadamente 5%). Pasado este tiempo, la probabilidad es mucho menor.

La tuberculosis es una enfermedad prevenible y, por lo general, curable. Según datos de 2022, la tuberculosis fue la segunda causa de muerte a nivel mundial por un solo agente después del COVID-19. Se trata de una infección de gran relevancia para la salud pública mundial, debido a su alta mortalidad y morbilidad.

La vacunación se erige como el método económicamente más eficiente para la prevención y el tratamiento de la tuberculosis, ya que constituye un enfoque fundamental en la Estrategia Mundial de la OMS para poner fin a la tuberculosis en el 2035.

Una de las medidas más exitosas, en este sentido, es la vacuna contra el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), que se ha utilizado ampliamente en todo el mundo durante 140 años desde su aparición.

La BCG proporciona una protección significativa contra la tuberculosis grave en lactantes y niños pequeños, como la tuberculosis diseminada y la tuberculosis meníngea. Sin embargo, su eficacia contra la tuberculosis pulmonar (TBP) en adultos es limitada y variable y no proporciona ninguna protección efectiva contra la infección tuberculosa primaria o latente causada por la tuberculosis.

No todas las personas infectadas con la bacteria de la tuberculosis desarrollan la enfermedad. Como resultado, existen dos afecciones relacionadas: la infección tuberculosa latente y la enfermedad de tuberculosis.

Tras la infección por tuberculosis, en un plazo de 2 a 8 semanas, los macrófagos ingieren y rodean los bacilos tuberculosos. Estas células forman una capa a modo de barrera llamada granuloma que mantiene a los bacilos contenidos y bajo control. Esta condición se conoce como infección de tuberculosis latente.

En la infección de tuberculosis latente, las bacterias pueden vivir en el cuerpo sin producir enfermedad ni ser capaces de contagiar de tuberculosis. Sin embargo, necesitan recibir un tratamiento adecuado para prevenir el desarrollo de la enfermedad.

La enfermedad de tuberculosis ocurre cuando los bacilos se multiplican rápidamente y el sistema inmunitario no es capaz de controlar esta proliferación por diferentes razones. Este proceso puede ocurrir en diferentes zonas del cuerpo, como los pulmones, los riñones, el cerebro o los huesos.

La progresión de la infección latente a la enfermedad de tuberculosis puede ocurrir en cualquier momento, pero es más frecuente en los dos primeros años tras la infección, o en personas que tienen el sistema inmunitario más débil debido a ciertos medicamentos o afecciones médicas como diabetes, cáncer o VIH.

PERSONAS CON TUBERCULOSIS LATENTE	PERSONAS CON ENFERMEDAD DE TUBERCULOSIS
Tienen una pequeña cantidad de bacterias en el cuerpo que están vivas pero inactivas	Tienen una gran cantidad de bacterias activas en su cuerpo
No puede transmitir la bacteria de la tuberculosis a otras personas.	Puede transmitir la bacteria de la tuberculosis a otras personas
Por lo general, tienen resultados positivos en tests sanguíneos o en la prueba de la tuberculina que indican infección por tuberculosis	Por lo general, tienen un resultado positivo en tests sanguíneos o en la prueba de la tuberculina que indica infección de tuberculosis
Tienen frotis y cultivos de esputo negativos	Puede tener frotis y cultivos de esputo positivos
Debe considerar el tratamiento para la infección de tuberculosis latente para prevenir el desarrollo de la enfermedad	Necesita tratamiento para la enfermedad de tuberculosis
No requieren aislamiento respiratorio	Puede requerir aislamiento respiratorio

Los síntomas más comunes de la enfermedad de tuberculosis incluyen:

- Tos prolongada
- Dolor en el pecho
- Debilidad o fatiga
- Pérdida de peso
- Fiebre
- Sudores nocturnos

Estos síntomas pueden ser leves durante muchos meses, lo que conduce a un retraso en la asistencia al centro médico aumentando así el riesgo de propagar la infección a otras personas.

En el caso de sospecha de enfermedad de tuberculosis pulmonar, se les pedirá a los pacientes que entreguen una muestra de esputo para realizar pruebas de detección de la bacteria.

En el caso de la enfermedad de tuberculosis no pulmonar, se pueden analizar muestras de los fluidos y tejidos corporales afectados.

Las enfermedades causadas por micobacterias no tuberculosas (NTM) tienen un impacto importante en la salud pública a nivel mundial. Se ha descrito un aumento en la incidencia y en la prevalencia de estas enfermedades relacionados principalmente con el creciente número de pacientes con enfermedad pulmonar causada por el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) en muchos países. Las NTM causan infecciones que se pasan por alto fácilmente, son difíciles de diagnosticar y difíciles de tratar.

Los hábitats naturales de la NTM van desde aguas salobres y pantanosas naturales hasta sistemas municipales de distribución de agua y tuberías domésticas, incluidos los cabezales de ducha. Las NTM también se encuentran en tierra para macetas y otros suelos ricos en turba. Esta superposición del hábitat bacteriano con el hábitat humano proporciona una oportunidad ideal para la infección humana.

Generalmente se acepta que las NTM se adquieren mediante ingestión, inhalación y contacto dérmico, y esto puede dar lugar a casos de linfadenitis, infecciones pulmonares y diseminadas e infecciones de la piel y los tejidos blandos. No hay evidencia de transmisión de la infección por NTM de persona a persona. Sin embargo, en el caso del *M. abscessus* subsp *massiliense* se han descrito casos en pacientes con fibrosis quística que podrían asociarse a una transmisión dentro de un hospital o clínica, aunque no se ha establecido de manera inequívoca si la transmisión ocurrió directa o indirectamente entre pacientes.

Aunque no está claro por qué las NTM han aumentado, hay varios factores que pueden estar contribuyendo: (i) un aumento de las fuentes de infección por micobacterias en el medio ambiente, (ii) un aumento en el número de individuos susceptibles, (iii) mejoras de técnicas de detección en el laboratorio, y (iv) mayor conciencia sobre las enfermedades NTM.

Además, a diferencia de la tuberculosis causada por *M. tuberculosis*, la notificación de la infección por NTM no es de declaración obligatoria; por lo tanto, es difícil determinar la incidencia y prevalencia de las diferentes especies de NTM. Sin embargo, la prevalencia de la infección por NTM está aumentando en Estados Unidos, Europa y otros países desarrollados del mundo occidental. La mayor incidencia de infecciones por NTM está asociada con una disminución de las tasas de tuberculosis causada por *M. tuberculosis* en áreas de niveles socioeconómicos más altos.

Una revisión que incluye 22 estudios entre 1946 y 2014 ha demostrado una disminución del 81% en la tasa de incidencia de tuberculosis (TB), mientras que la enfermedad por NTM aumentó en un 94% en casi todas las áreas geográficas. Su importancia se debe al aumento de infecciones oportunistas que se producen a causa de la NTM, principalmente en personas gravemente inmunocomprometidas, personas con patologías pulmonares congénitas o adquiridas e infecciones asociadas con la atención sanitaria. Sin embargo, también se ha observado un aumento de la incidencia de la enfermedad NTM en personas que no están inmunocomprometidas y sin ninguna enfermedad pulmonar preexistente.

- **Diagnóstico**

Las pruebas diagnósticas para la enfermedad de tuberculosis han mejorado sustancialmente en los últimos años. La OMS recomienda las pruebas rápidas de diagnóstico molecular como primera opción para las personas que muestran signos y síntomas de tuberculosis.

El método más antiguo es la baciloscopia de esputo (desarrollado hace más de 100 años) todavía se usa ampliamente para el diagnóstico de la tuberculosis en los países de ingresos bajos y medianos, pero cada vez más se está reemplazando por pruebas rápidas.

Las pruebas de cultivo siguen siendo el estándar de referencia para el diagnóstico de la tuberculosis. Además, el cultivo es necesario para la detección de resistencia a los nuevos fármacos antituberculosos y también puede utilizarse como prueba confirmatoria en entornos y situaciones en los que las personas tienen una baja probabilidad de tener enfermedad de tuberculosis antes de la prueba.

Después del diagnóstico, tanto el cultivo como el frotis (a diferencia de las pruebas moleculares rápidas) son necesarios para controlar la respuesta de un individuo al tratamiento.

Las técnicas moleculares han ganado protagonismo en el diagnóstico de la tuberculosis, así como en la identificación de diferentes especies, permitiendo, en etapas muy tempranas distinguir entre tuberculosis causada por el complejo *M. tuberculosis* y enfermedades causadas por complejos no tuberculosos.

Los ensayos basados en PCR donde se amplifican genes o regiones específicas se utilizan cada vez más por su precisión, alta sensibilidad y especificidad y por su capacidad de proporcionar resultados rápidos directamente a partir de diferentes tipos de muestras, lo que facilita el diagnóstico temprano, crucial para suministrar un tratamiento eficaz lo antes posible.

La técnica de PCR es especialmente valiosa en situaciones donde los métodos de cultivo tradicionales pueden resultar lentos o desafiantes debido a las características de crecimiento lento de algunas micobacterias o incluso cuando la tinción de Ziehl Neelsen es positiva pero no es posible distinguir entre el complejo *M. tuberculosis* y complejos no tuberculosos.

Otras herramientas de diagnóstico complementarias podrían incluir técnicas radiológicas como la radiografía de tórax o incluso la tomografía computarizada de alta resolución (TCAR) de tórax en su caso.

- **Tratamiento**

De acuerdo con las directrices actuales de la OMS para el tratamiento de la tuberculosis, éste se prescribe durante 2 meses donde se administran 4 antibióticos, isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA), seguido de un período de 4 meses con dos antibióticos, INH y RIF.

La duración de este tratamiento dificulta la adherencia del paciente y, en consecuencia, limita su eficacia general.

Drug	Recommended dose			
	Daily		Three times weekly	
	Dose and range (mg/kg body weight)	Maximum (mg)	Dose and range (mg/kg body weight)	Daily maximum (mg)
isoniazid	5 (4–6)	300	10 (8–12)	–
rifampicin	10 (8–12)	600	10 (8–12)	600
pyrazinamide	25 (20–30)	–	35 (30–40)	–
ethambutol	children 20 (15–25) adults 15 (15–20)	–	30 (25–35)	–
streptomycin	15 (12–18)	–	15 (12–18)	–

Sin embargo, existen situaciones de resistencia a estos fármacos (tuberculosis multirresistente o MDR-TB), que requieren un esquema de tratamiento más complejo y prolongado y que generalmente implica una combinación de fármacos de segunda línea (fluoroquinolonas, inyectables de segunda línea, bedaquilina, linezolid, etc), y la duración del tratamiento puede ser de 18-24 meses, dependiendo de cada caso y de los fármacos disponibles.

Por otro lado, las NTM presentan una alta variabilidad en su resistencia a los medicamentos, por lo que no responden al mismo tratamiento estándar que se aplica para la tuberculosis.

Algunas especies de NTM, como *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium abscessus*, son resistentes a los fármacos antituberculosos comunes y pueden requerir tratamientos personalizados con combinaciones de antibióticos como claritromicina, amikacina y linezolid, entre otros. Los tratamientos para las infecciones por NTM suelen ser más prolongados y varían según la especie de micobacteria, la gravedad de la infección y el estado inmunológico del paciente.

Normalmente estos tratamientos incluyen macrólidos como principal diferencia respecto al tratamiento de la tuberculosis.

Los macrólidos (claritromicina y azitromicina) son la piedra angular del tratamiento de la enfermedad pulmonar causada por el complejo *Mycobacterium avium*. El régimen opcional estándar incluye rifamicina (rifampicina o rifabutina), etambutol y un macrólido administrados durante 18 a 24 meses, incluidos 12 meses de negatividad en el cultivo de esputo.

Las infecciones causadas por el complejo *M. abscessus* son extremadamente difíciles de tratar debido a su alta resistencia a los fármacos antimicrobianos y a los desinfectantes. No existe un tratamiento estándar, pero las pautas actuales recomiendan un régimen de tratamiento con múltiples antibióticos que contenga macrólidos y puede requerir ajustes según la especie identificada y el estado del paciente.

A continuación, se muestra solo un ejemplo de tratamiento:

Mycobacterium Species	Established Regimens	Additional or Suggested Agents
<i>M. avium</i> complex	rifampin, ethambutol, isoniazid, streptomycin or amikacin	clarithromycin (azithromycin), ciprofloxacin, clofazimine
<i>M. abscessus</i>	amikacin, streptomycin, ceftoxitin	clofazimine, clarithromycin, a cocktail of azithromycin, imipenem, clarithromycin,

Diferenciar entre micobacterias tuberculosas y no tuberculosas es fundamental para garantizar un tratamiento eficaz y adecuado, prevenir la propagación de la tuberculosis y gestionar correctamente los casos de NTM que, si bien no se transmiten de persona a persona, pueden ser graves en poblaciones vulnerables.

En este contexto, VIRCELL S.L lanza al mercado el MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT para la detección de ácidos nucleicos procedentes de especies micobacterianas pertenecientes a los complejos *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), *Mycobacterium avium* (MAC) y *Mycobacterium abscessus* (MABSC), así como otras especies micobacterianas no tuberculosas (NTM) en muestras de esputo.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

1. Nombre / Referencias / Uso indicado / Situación reglamentaria.

Nombre:	MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT
Referencias:	RTPCR016-LP y RTPCR016-LPD.
Uso indicado:	Kit de PCR en tiempo real para la detección de ácidos nucleicos de especies micobacterianas pertenecientes a los complejos <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC), <i>Mycobacterium avium</i> (MAC) y <i>Mycobacterium abscessus</i> (MABSC), así como otras especies micobacterianas no tuberculosas (NTM) en muestras de esputo.
Situación reglamentaria:	CE ₀₁₂₃ (CE-IVDR).

2. Características principales de la prueba.

- Dianas incluidas en el kit: un fragmento específico de la secuencia de inserción *IS1081* para MTBC (marcado con Texas Red/ROX), un fragmento específico de la región espaciadora intergénica (*ITS*) (*16S-23S rRNA*) para MAC (marcado con Cy5) y MABSC (marcado con HEX) y un fragmento específico del gen *16S rRNA* del género *Mycobacterium* (marcado en FAM).
- Se incluye un control interno para comprobar la calidad de la muestra, la ausencia de arrastre de inhibidores de amplificación y la correcta configuración de la amplificación. Este control consiste en *la ARNasa P humana* (marcado con Q705/Cy5.5).
- Un vial liofilizado contiene todos los reactivos necesarios para la PCR: la polimerasa Taq, tampón y oligonucleótidos/sondas específicos para la detección de los diferentes complejos MTBC, MAC, MABSC y NTM, así como cebadores y sonda para el control interno.
- Presentación en formato pre-dispensado en tubos PCR blancos de bajo perfil (0,1ml). Existen dos presentaciones diferentes para una mayor comodidad del cliente.

3. Ventajas.

- Único Kit que utiliza RTPCR para la detección de complejos MTBC, MAC, MABSC y el género *Mycobacterium* en el mismo ensayo (hasta la fecha).
- Detección de todas las especies y subespecies dentro de los complejos MTBC, MAC y MABSC.
- Diferencia entre el complejo de micobacterias *tuberculosas* y el complejo de micobacterias *no tuberculosas*.
- La diferenciación de estos complejos es importante para abordar mejor las opciones de tratamiento.
- Resultados rápidos y fiables en menos de 2 horas.
- Master Mix liofilizado y control positivo para garantizar la estabilidad y reducir los costes de transporte en comparación con los productos en formato congelado.

4. Ejemplos de resultados de amplificación obtenidos con MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT

Leyenda:

Azul (FAM): Mycobacteria

Verde (HEX/VIC): Complejo *Mycobacterium abscessus* (MABSC)

Púrpura (Cy5): Complejo *Mycobacterium avium* (MAC)

Rojo (Texas/ROX): Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

Marrón (Q705/Cy5.5): CI

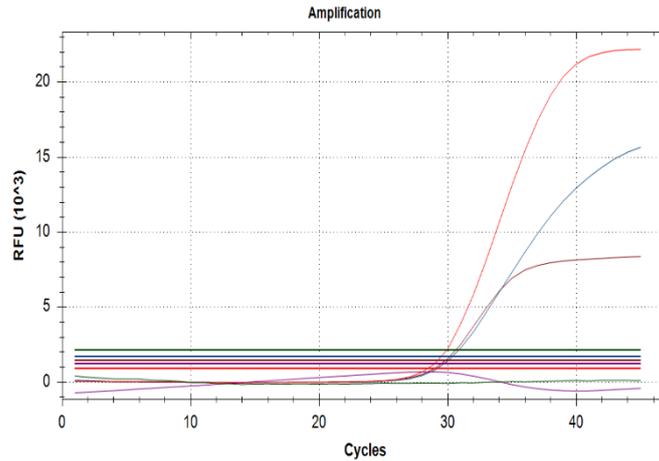


Figura 1: Resultado positivo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC).

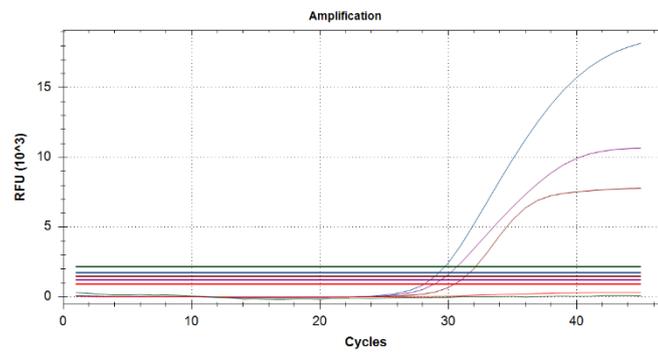


Figura 2. Resultado positivo del complejo *Mycobacterium avium* (MAC).

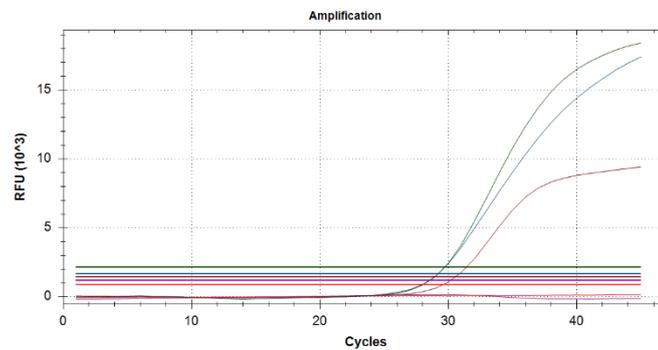


Figura 3. Resultado positivo del Complejo *Mycobacterium abscessus* (MABSC)

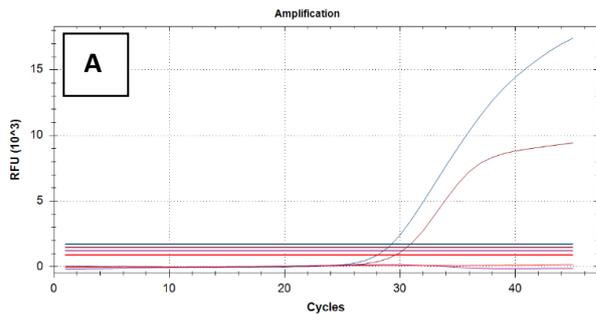


Figura 4 A.: Resultado positivo para micobacterias no tuberculosis (NTM) (valor CT < 37)

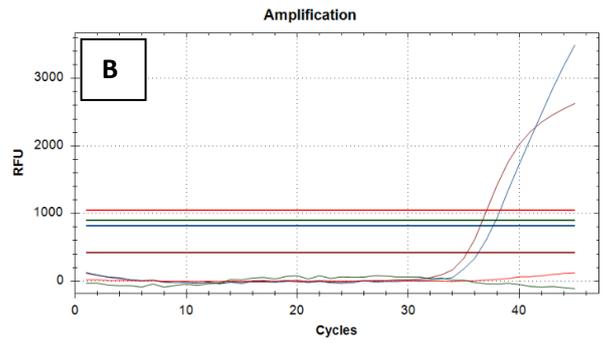


Figura 4 B.: Resultado negativo de micobacterias no tuberculosis (NTM) (valor CT > 37)

Ejemplos con coinfecciones con dos o tres complejos:

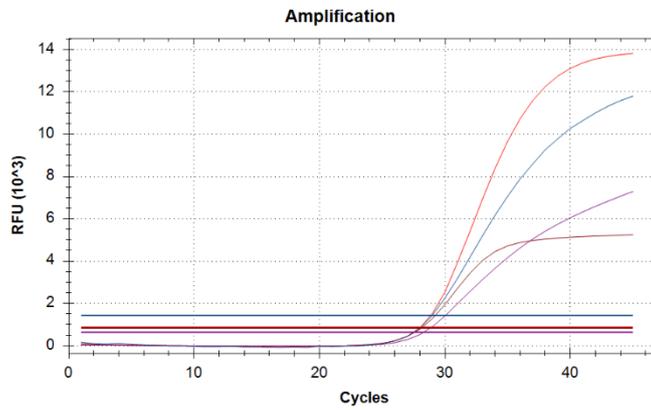


Figura 5. Resultado positivo de MTBC + MAC.

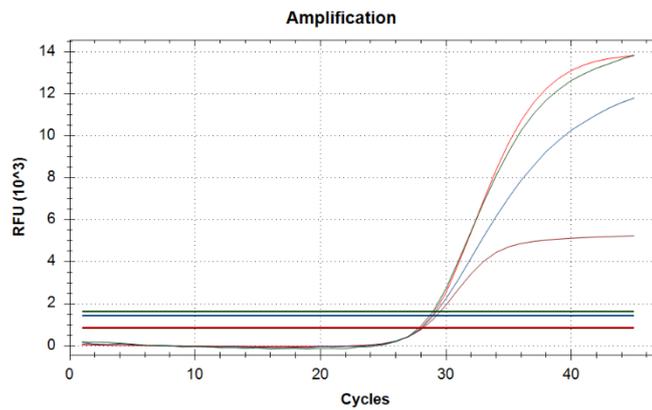


Figura 6. Resultado positivo de MTBC + MAMSC.



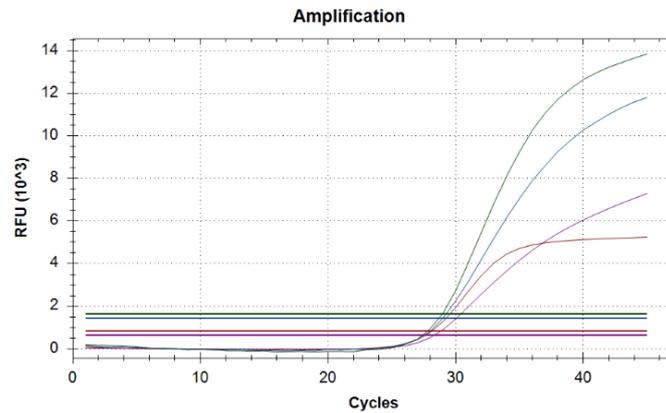


Figura 7. Resultado positivo de MAC + MABSC

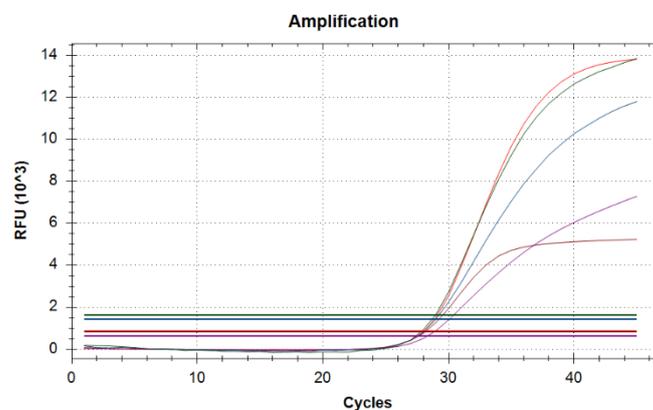


Figura 8. Resultado positivo de MTBC + MAC + MABSC

5. Tipo de muestra.

La muestra validada con el kit MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT es esputo. Para una manipulación segura, es necesario que las muestras de esputo se inactiven (30 minutos a 95 °C) antes de la etapa de extracción.

6. Tecnología.

PCR en tiempo real en un solo paso, adecuado para termocicladores con cinco canales de detección fluorescentes (FAM y HEX/VIC, Texas Red/ROX, Cy5 y Q705/Cy5.5) compatibles con tubos de PCR blancos de bajo perfil (0,1 ml).

7. Formato del kit.

Formato pre-dispensado en tubos PCR blancos de perfil bajo de 0,1ml (RTPCR016-LP y RTPC016-LPD con 24 y 96 pruebas respectivamente).



RTPCR016-LPD: 1 placa PCR divisible de 96 pocillos con Master Mix liofilizada predispensada que se puede separar fácilmente en 12 tiras de 8 tubos. Los usuarios pueden separar las tiras necesarias para la carrera y almacenar el resto de ellas sin afectar a la fecha de caducidad.



RTPCR016-LP: 3 tiras de 8 pocillos separadas con Master Mix liofilizada predispensada. Los usuarios pueden utilizar las tiras necesarias para la carrera y almacenar el resto de ellas sin afectar a la fecha de caducidad.

8. Validación y compatibilidad con sistemas de PCR en tiempo real.

Referencia	Termociclador PCR en tiempo real (5 canales de detección)
RTPCR016-LP	<ul style="list-style-type: none"> • CFX96 Touch™/CFX OPUS™ (Bio-Rad Laboratories) - Validado
RTPCR016-LPD	<ul style="list-style-type: none"> • Azure Cielo 6 (Azure Biosystems)- Compatible • QuantStudio 5 (QS5) (ThermoFischer)- Compatible

9. Validación y compatibilidad con sistemas de extracción.

- **Tanbead** (Maelstrom 4800)- **Validado**
- Se espera que otros sistemas estándar sean compatibles, tales como:
 - **Chroma** (MagXtract 3200)
 - **Tanbead** (Maelstrom 9600)
 - **BioMérieux** (NucliSENS® easyMag®)
 - **Roche** (MagNA Pure System)
 - **ThermoFisher** (KingFisher Flex)
 - **Bruker** (GenoXtract 12)
 - Otros

10. Material necesario, pero no suministrado.

- Campana de flujo laminar
- Termociclador qRT-PCR compatible
- Kit de extracción de ARN
- Pipetas / Puntas con filtro
- Microcentrífuga
- Cabina de PCR (recomendado)
- Vórtex.

11. Duración de la técnica.

El tiempo de manipulación después de obtener el ADN purificado es inferior a 2 minutos ya que el producto está liofilizado y solo requiere reconstitución y adición del ADN de la muestra. El tiempo del termociclador dependerá del modelo, aunque suele ser inferior a 2 horas.

12. Programación del instrumento de PCR en tiempo real.

Inserte los tubos/tiras de PCR en el termociclador en tiempo real y ejecute el siguiente programa*:

1 ciclo: 95°C 3 minutos
 45 ciclos: 95°C 15 segundos
 60°C 45 segundos*

*Se deben capturar los datos de fluorescencia (FAM, HEX/VIC, Texas/ROX, Cy5 y Q705/Cy5.5).

13. Interpretación de los resultados

Se recomienda incluir un control negativo en cada ensayo realizado. El control negativo monitoreará la contaminación del reactivo o del medio ambiente.

Se recomienda incluir el control positivo en cada ejecución. El control positivo supervisa los fallos de los reactivos y el correcto funcionamiento de los procedimientos esenciales.

Es probable que el software del termociclador calcule automáticamente el valor de fluorescencia de referencia (umbral) en función de la curva de amplificación para cada diana (detección de fluorescencia). No obstante, se recomienda establecer los umbrales para los diferentes canales de detección individualmente. Con el fin de establecer un umbral para cada diana, se recomienda utilizar como referencia las curvas de amplificación de los controles positivo y negativo. El umbral debe fijarse al principio de la lectura exponencial de la fluorescencia y por encima de la señal de fondo.

La interpretación de los resultados de los controles es la siguiente:

CONTROL	Mycobacteria (FAM)	MABSC (HEX/VIC)	MTBC (Texas/ROX)	MAC (Cy5)	CI (Q705/Cy5.5)	Interpretación
VIRCELL MTBAVAB CONTROL POSITIVO	Amplificación (Ct < 40)	Correcto				
	Sin amplificación o Ct >40	No válido				
CONTROL NEGATIVO VIRCELL	Sin amplificación o Ct >40	Correcto				
	Amplificación (Ct < 40)	Sin amplificación o Ct >40	No válido			

Posibles resultados que se pueden obtener con el MYCOBACTERIUM RTPCR KIT:

RESULTADO	Mycobacteria (FAM) ²	MABSC (HEX/VIC)	MTBC (Texas/ROX)	MAC (Cy5)	CI (Q705/Cy5.5) ¹	Interpretación
1	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	No válido (relacionado con la muestra/kit/configuración)
2	Sin amplificación o Ct >37	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	Amplificación (Ct < 40)	Negativo
3	Amplificación (Ct < 37)	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	Amplificación (Ct < 40) o Sin amplificación	MNA
4	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40)	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	Amplificación (Ct < 40) o Sin amplificación	MABSC
5	Amplificación (Ct < 40)	Sin amplificación o Ct >40	Sin amplificación o Ct >40	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40) o Sin amplificación	MAC
6	Amplificación (Ct < 40)	Sin amplificación o Ct >40	Amplificación (Ct < 40)	Sin amplificación o Ct >40	Amplificación (Ct < 40) o Sin amplificación	MTBC
7	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40)	Sin amplificación o Ct >40	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40) o Sin amplificación	MABSC + MAC
8	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40)	Sin amplificación o Ct >40	Amplificación (Ct < 40) o Sin amplificación	MABSC + MTBC
9	Amplificación (Ct < 40)	Sin amplificación o Ct >40	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40) o Sin amplificación	MAC + MTBC
10	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40)	Amplificación (Ct < 40) o Sin amplificación	MABS + MAC + MTBC

¹ En caso de un alto número de copias del ácido nucleico diana, la amplificación del control interno (CI) en los resultados 3 a 10 puede verse afectada. La amplificación tardía o la ausencia de amplificación del CI no cambia la interpretación del resultado.

² En muestras límite positivas, puede haber amplificación en los canales HEX/VIC (MABSC), Cy5 (MAC) y/o Texas/ROX (MTBC) y que no haya amplificación en el canal FAM (NTM) ni amplificación con Ct >37. El resultado se considerará válido.

Se observaron curvas de amplificación con Ct >37 en el canal FAM debido a Mycobacterias ambientales.

En caso de que el resultado no sea válido o no concluyente, se recomienda volver a extraer el ADN/ARN de la muestra original y volver a analizarlo. En el caso de fallo de amplificación del control interno, se podría suponer una extracción inadecuada de los ácidos nucleicos o una inhibición de la amplificación. Se recomienda probar una nueva muestra.

14. Número de tests por Kit.

RTPCR016-LP: 24 tests

RTPCR016-LPD: 96 tests

15. Necesidades de transporte.

Temperatura ambiente. Liofilizado.

16. Reactivos incluidos en el kit.

Ref. RTPCR006-LP (24 tests)	Ref. RTPCR006-LPD (96 tests)
3 tubos de tira de PCR de 8 pocillos	12 tubos de tiras de PCR de 8 pocillos
Soluciones de reconstitución	Soluciones de reconstitución
Control positivo	Control positivo
Control negativo	Control negativo
6 x 8 tapas de tubo de tira	12x 8 tapas de tubo de tiras

17. Sensibilidad y especificidad clínica

Complejo *Mycobacterium abscessus*

Se analizaron muestras positivas de esputo humano procesado (n=50) y muestras de esputo humano negativas previamente confirmadas (n=51). Las muestras se compararon con un kit comercial de PCR en tiempo real.

Las muestras se extrajeron utilizando el kit OptiPure Viral en el instrumento Maelstrom 4800 (TANBead) y se amplificaron en CFX96 (Bio-Rad).

Los resultados fueron los siguientes:

No. Muestras	101	
Sensibilidad (%)	100	
	IC del 95%	93-100
Especificidad (%)	100	
	IC del 95%	93-100
VPP (%)	100	
VPN (%)	100	
LR+/LR-	-1.01/-0.99	
Verdadero Positivo	50	
Verdadero negativo	51	
Falso positivo	0	
Falso negativo	0	
Dudosos	0	

Complejo *Mycobacterium avium*

Se analizaron muestras positivas de esputo humano procesado (n=49) y muestras de esputo humano negativas previamente confirmadas (n=51). Las muestras se compararon con un kit comercial de PCR en tiempo real.

Las muestras se extrajeron utilizando el kit OptiPure Viral en el instrumento Maelstrom 4800 (TANBead) y se amplificaron en CFX96 (Bio-Rad).

Los resultados fueron los siguientes:

No. Muestras	100	
Sensibilidad (%)	100	
	IC del 95%	93-100
Especificidad (%)	100	
	IC del 95%	93-100
VPP (%)	100	
VPN (%)	100	
LR+/LR-	-1.01/-0.99	
Verdadero Positivo	49	
Verdadero negativo	51	
Falso positivo	0	
Falso negativo	0	
Dudosos	0	

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Se analizaron muestras positivas de esputo humano procesado (n = 58) y muestras de esputo humano negativas previamente confirmadas (n = 51). Las muestras se compararon con un kit comercial de PCR en tiempo real.

Las muestras se extrajeron utilizando el kit OptiPure Viral en el instrumento Maelstrom 4800 (TANBead) y se amplificaron en CFX96 (Bio-Rad).

Los resultados fueron los siguientes:

No. Muestras.	109	
Sensibilidad (%)	100	
	IC del 95%	94-100
Especificidad (%)	100	
	IC del 95%	93-100
VPP (%)	100	
VPN (%)	100	
LR+/LR-	-1.01/-0.99	
Verdadero Positivo	58	
Verdadero negativo	51	
Falso positivo	0	
Falso negativo	0	
Dudosos	0	

Micobacterias no tuberculosas

Se analizaron muestras positivas de esputo humano procesado (n = 51) y muestras de esputo humano negativas previamente confirmadas (n = 51). Las muestras se compararon con un kit comercial de PCR en tiempo real.

Las muestras se extrajeron utilizando el kit OptiPure Viral en el instrumento Maelstrom 4800 (TANBead) y se amplificaron en CFX96 (Bio-Rad).

Los resultados fueron los siguientes:

No. Muestras	102	
Sensibilidad (%)	98	
	IC del 95%	90-100
Especificidad (%)	100	
	IC del 95%	93-100
VPP (%)	100	
VPN (%)	98	
LR+/LR-	-0.99/-0.97	
Verdadero Positivo	50	
Verdadero negativo	51	
Falso positivo	0	
Falso negativo	1	
Dudosos	0	

IC: Intervalo de confianza

PPV: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

LR+: Coeficiente de verosimilitud positivo

LR-: Coeficiente de verosimilitud negativo

18. Precisión

Se amplificaron 6 muestras (4 positivas y los controles positivos y negativos) dos veces en 2 tandas por día en 2 termocicladores qRT-PCR diferentes durante 20 días consecutivos. Las muestras se realizaron en CFX96 (Bio-Rad). Se determinó la precisión dentro de la serie, la precisión entre carreras, la precisión entre días y la precisión dentro del laboratorio.

Los resultados fueron los siguientes:

Complejo *Mycobacterium abscessus*

Muestra	Precisión dentro de la corrida %CV	Precisión entre corridas %CV	Precisión entre días %CV	Precisión dentro del laboratorio %CV
Control positivo	0.6	0.8	0.1	1.0
Muestra positiva 1	0.7	1.0	0.6	1.4
Muestra positiva 2	1.7	0.8	1.0	2.1
Muestra positiva 3	0.7	1.0	1.0	1.6
Muestra positiva 4	0.8	0.9	0.3	1.2
Control negativo	Sin amplificación	Sin amplificación	Sin amplificación	Sin amplificación

Complejo *Mycobacterium avium*

Muestra	Precisión dentro de la corrida %CV	Precisión entre corridas %CV	Precisión entre días %CV	Precisión dentro del laboratorio %CV
Control positivo	0.4	1.1	0.7	1.3
Muestra positiva 1	1.0	1.1	0.7	1.7
Muestra positiva 2	1.3	1.4	0.7	2.1
Muestra positiva 3	0.7	0.6	0.6	1.2
Muestra positiva 4	1.9	0.8	0.3	2.1
Control negativo	Sin amplificación	Sin amplificación	Sin amplificación	Sin amplificación

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Muestra	Precisión dentro de la corrida %CV	Precisión entre corridas %CV	Precisión entre días %CV	Precisión dentro del laboratorio %CV
Control positivo	0.3	0.6	0.3	0.7
Muestra positiva 1	0.6	0.5	0.7	1.1
Muestra positiva 2	0.9	0.2	0.6	1.1
Muestra positiva 3	0.6	0.3	0.7	1.0
Muestra positiva 4	0.9	0.7	0.3	1.2
Control negativo	Sin amplificación	Sin amplificación	Sin amplificación	Sin amplificación

Micobacterias no tuberculosas

Muestra	Precisión dentro de la corrida %CV	Precisión entre corridas %CV	Precisión entre días %CV	Precisión dentro del laboratorio %CV
Control positivo	0.5	1.0	0.6	1.3
Muestra positiva 1	0.8	1.2	0.7	1.6
Muestra positiva 2	0.8	0.8	1.1	1.6
Muestra positiva 3	0.8	1.5	1.1	2.0
Muestra positiva 4	1.1	1.5	0.5	2.0
Control negativo	Sin amplificación	Sin amplificación	Sin amplificación	Sin amplificación

19. Interferencia

Se ha realizado un estudio para evaluar el efecto de sustancias potencialmente interferentes. Las muestras se extrajeron utilizando el kit OptiPure Viral en el instrumento Maelstrom 4800 (TANBead) y se ejecutaron en CFX96 (Bio-Rad). Los resultados fueron los siguientes:

Sustancias que interfieren	No. Muestras	Máxima concentración añadida sin interferencias
Mucina	2	2,5 mg/ml
Paracetamol	2	1324 µmol/L
Rifampicina	2	25 µg/mL
Ibuprofeno	2	2425 µmol/L
Nicotina	2	6,2 µmol/L
Acetilcisteína	2	10,2 mmol/L
Ebastine	2	0,78 µmol/L
Sangre entera humana	2	2% (v/v)
Aerosol nasal de solución salina	2	10% (v/v)

20. Reacciones cruzadas

Se ha realizado un estudio para evaluar el efecto de posibles reacciones cruzadas con otros microorganismos. Las muestras se amplificaron en el termociclador CFX96 (Bio-Rad).

Los resultados fueron los siguientes:

Microorganismo	No. Muestras	No. positivos
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0
Adenovirus 31	1	0
Adenovirus 7	1	0
Adenovirus 8	1	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	0
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1	0
<i>Bordetella holmesii</i>	1	0
<i>Bordetella parapertussis</i>	1	0
<i>Bordetella pertussis</i>	1	0
<i>Candida albicans</i>	1	0
<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	1	0
<i>Chlamydomydia psittaci</i>	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1	0
Citomegalovirus	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0
Virus de Epstein-Barr	1	0
<i>Escherichia coli</i> (EIEC)	1	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	0
HCoV-NL63	1	0
Metapneumovirus humano	1	0
Influenza A virus H1N1	1	0
Virus de la influenza B	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0

Microorganismo	No. Muestras	No. positivos
<i>Legionella bozemanii</i> (<i>Fluoribacter bozemaniae</i>)	1	0
<i>Legionella dumoffii</i> (<i>Fluoribacter dumoffii</i>)	1	0
<i>Legionella longbeachae</i>	1	0
<i>Legionella micdadei</i>	1	0
<i>Legionella pneumophila</i>	1	0
Virus del sarampión	1	0
MERS-CoV	1	0
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1	0
<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	1	0
<i>Nocardia asteroides</i>	1	0
Virus de la parainfluenza 1	1	0
Virus de la parainfluenza 2	1	0
Virus de la parainfluenza 3	1	0
Virus de la parainfluenza 4	1	0
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0
Virus respiratorio sincitial subtipo A	1	0
Virus respiratorio sincitial subtipo B	1	0
Rinovirus	1	0
<i>Rhodococcus equi</i>	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (mecA-)	1	0
<i>Streptococo agalactiae</i>	1	0
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	0
TOTAL	53	0

Además, se realizó un análisis *in silico* de las secuencias de los cebadores/sonda en comparación con otros microorganismos que se podían encontrar en las muestras clínicas. Los resultados fueron los siguientes:

Microorganismo	Homología >80%			
	MABSC	MAC	MTBC	NTM
<i>Actinomyces meyeri</i>	No	No	Sí	No
<i>Actinomyces naeslundii</i>	No	Sí	Sí	Sí
<i>Actinomyces pyogenes (Trueperella pyogenes)</i>	No	Sí	No	No
Bocavirus	No	No	No	No
<i>Chlamydia caviae</i>	No	No	No	Sí
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	No	No	Sí	Sí

Microorganismo	Homología >80%			
	MABSC	MAC	MTBC	NTM
<i>Corynebacterium xerosis</i>	No	Sí	Sí	Sí
<i>Eikenella corrodens</i>	No	No	Sí	Sí
<i>Pasteurella multocida</i>	Sí	No	No	Sí
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Sí	Sí	Sí	No
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sí	Sí	Sí	Sí
<i>Streptococcus mitis</i>	No	Sí	No	No
<i>Streptococcus mutans</i>	No	No	No	Sí

"Sí" indica microorganismos que mostraron > 80% de homología con respecto a uno de los cebadores, pero no con ningún otro cebador incluido en el ensayo. No se pudo probar la reacción cruzada y/o la interferencia con el ensayo debido a la presencia de estos organismos, pero es poco probable que ocurra.

21. Sensibilidad analítica

Se determinó un LoD (límite de detección) preliminar mediante el ensayo de diluciones en serie de muestras cuantificadas de MTBC, MAC, MABSC y NTM. Las muestras se extrajeron utilizando el kit OptiPure Viral en el instrumento Maelstrom 4800 (TANBead) y se amplificaron en CFX96 (Bio-Rad).

Una vez que se determina un LoD aproximado, se confirma la concentración final mediante pruebas de 3 diluciones seriadas. Se analiza un mínimo de 20 repeticiones para cada dilución. El LoD se determina como la concentración más baja donde \geq el 95% de las réplicas son positivas.

	MABSC	MAC	MTBC	NTM
LoD (copias/ μ l)	3	3	0.2	6
LoD (copias/ml)	400	400	23.1	800
LoD (copias/reacción)	15	15	0.9	30

22. Inclusión analítica

Se realizó un análisis *in silico* de los fragmentos diana incluidos en el ensayo para determinar la inclusividad de las diferentes secuencias de especies/subespecies MTBC, MAC, MABSC y NTM disponibles.

El criterio seleccionado para incluir las diferentes secuencias en el análisis fue la geografía y la fecha en que se depositó la secuencia. En el análisis de cada microorganismo se incluyeron diferentes linajes, tipos o subtipos.

Se utilizó la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para acceder a las secuencias.

Los resultados del análisis *in silico* muestran que se prevé que el kit detecte todas las variantes del genoma incluidas en el análisis.

Se analizó la inclusividad analítica del kit para la detección de MTBC, MAC, MABSC y NTM mediante el análisis de muestras representativas de las diferentes especies y subespecies. Las muestras se amplificaron en CFX96 (Bio-Rad).

Los resultados fueron los siguientes:

Microorganismo	No. Muestras	No. positivos	Interpretación de Resultados
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1	1	MTBC
<i>Mycobacterium microti</i>	1	1	MTBC
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	1	1	MTBC
<i>Mycobacterium caprae</i>	1	1	MTBC
<i>Mycobacterium bovis</i>	1	1	MTBC
<i>Mycobacterium africanum</i>	1	1	MTBC
<i>Mycobacterium avium</i>	1	1	MAC
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1	1	MAC
<i>Mycobacterium colombiense</i>	1	1	MAC
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	1	1	MAC
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1	1	MABSC
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	1	1	MABSC
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	1	1	MABSC
<i>Mycobacterium kansasii</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium malmoense</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium marinum</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium gastri</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium terrae</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium xenopi</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium celatum</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium genavense</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium mageritense</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium chimaera</i>	1	1	MAC
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium phlei</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1	1	NTM
<i>Mycobacterium elephantis</i>	1	1	NTM
TOTAL	33	33	

Todas las especies y subespecies analizadas dieron como resultado una amplificación positiva.

23. Controles externos recomendados

Los controles que se sugieren usar, pero que no se incluyen en el kit, son los siguientes:

- Como control positivo de la extracción:
 - AMPLIRUN® TOTAL MTB CONTROL (SPUTUM): Cat. MBTC013-R
 - AMPLIRUN® TOTAL MTB RIF RESISTANT CONTROL (SPUTUM) Cat. MBTC014-R
 - AMPLIRUN® TOTAL MTB INH RESISTANT (SPUTUM) Cat. MBTC015-R

Los controles externos se utilizan para monitorizar cualquier contaminación cruzada que se produzca durante el proceso de extracción, así como para validar los reactivos de extracción utilizados.

24. Bibliografía

1. Global tuberculosis report 2023. ISBN 978-92-4-008385-1 (electronic version) ISBN 978-92-4-008386-8.
2. Sakula A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*. 1982;37(4):246–51 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6180494>).
3. Centers for Disease Control and Prevention.
4. Clinical Overview of Tuberculosis Disease | Tuberculosis (TB) | CDC
5. Clinical Overview of Latent Tuberculosis Infection | Tuberculosis (TB) | CDC
6. Stephen V. Gordon, and Tanya Parish. 2018. Microbe Profile: Mycobacterium tuberculosis: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology Society Journal*. 164:437–439 DOI 10.1099/mic.0.000601
7. Faksri et al. BMC Genomics. 2016. In silico region of difference (RD) analysis of Mycobacterium tuberculosis complex from sequence reads using RD-Analyzer. 17:847. DOI 10.1186/s12864-016-3213-1
8. Ratnatunga CN, Lutzky VP, Kupz A, Doolan DL, Reid DW, Field M, Bell SC, Thomson RM and Miles JJ (2020) The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. *Front. Immunol*. 11:303. doi: 10.3389/fimmu.2020.00303
9. Bhanushali J, Jadhav U, Ghewade B, et al. (November 04, 2023) Unveiling the Clinical Diversity in Nontuberculous Mycobacteria (NTM) Infections: A Comprehensive Review. *Cureus* 15(11): e48270. DOI 10.7759/cureus.48270
10. Zhuang, L.; Ye, Z.; Li, L.; Yang, L.; Gong, W. Next-Generation TB Vaccines: Progress, Challenges, and Prospects. *Vaccines* 2023, 11, 1304. <https://doi.org/10.3390/vaccines11081304>
11. Caño-Muñiz S, Anthony R, Niemann S, Alffenaar J-WC. 2018. New approaches and therapeutic options for Mycobacterium tuberculosis in a dormant state. *Clin Microbiol Rev* 31:e00060-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00060-17>.