

# VIASURE

## Real Time PCR Detection Kits

by CerTest  
BIOTEC

### Tick Borne Diseases

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

VIASURE <i>Tick Borne Diseases</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 8-well strips, low profile	VS-TBD106L
VIASURE <i>Tick Borne Diseases</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 8-well strips, high profile	VS-TBD106H
VIASURE <i>Tick Borne Diseases</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 8-well strips, low profile	VS-TBD112L
VIASURE <i>Tick Borne Diseases</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 8-well strips, high profile	VS-TBD112H

## ENGLISH

---

### 1. Intended use

VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of viral RNA or genomic DNA specific for Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV), *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chafeensis*, *Ehrlichia muris*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), *Borrelia miyamotoi* and/or *Borrelia hermsii*, *Anaplasma phagocitophilum* and/or *Coxiella burnetii* in blood, serum, tissue samples and microbiological culture from ticks, biopsy skin, cerebrospinal fluid (CSF) and synovial fluid from patients with signs and symptoms of Tick Borne diseases. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of Tick Borne diseases in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA/DNA is extracted from clinical specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using fluorescent reporter dye probes specific TBEV, *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chafeensis*, *Ehrlichia muris*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato s.l., *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia hermsii*, *Anaplasma phagocitophilum* and *Coxiella burnetii*.

### 2. Summary and Explanation

Tick Borne diseases comprise a group of infections transmitted to humans by the bite of ticks infected with bacteria, viruses, or parasites. Tick Borne diseases affecting humans include: Lyme disease, relapsing fever, babesiosis, anaplasmosis, ehrlichiosis, Q fever, Tick Borne encephalitis and spotted fever among others.

Lyme disease (or Lyme borreliosis) is the most common Tick Borne disease worldwide. It is caused by the spirochaete *Borrelia burgdorferi* and it is transmitted to humans through the bite of infected blacklegged ticks of the genus *Ixodes*. Typical symptoms of Lyme disease include fever, headache, fatigue and a characteristic skin rash called erythema migrans. If left untreated, infection can spread to joints, the heart, and the nervous system.

*Borrelia miyamotoi* and *B. hermsii* are species of spiral-shaped bacteria that is closely related to the bacteria that cause tick-borne relapsing fever (TBRF). First identified in 1995 in ticks from Japan, *B. miyamotoi* has also been detected in different *Ixodes* ticks species, whereas spirochete *Borrelia hermsii* is transmitted by its argasid tick vector, *Ornithodoros hermsi*. Patients with this infection were most likely to have fever, chills, and headache. Other common symptoms included body and joint pain and fatigue.

Anaplasmosis is caused by the bacterium *Anaplasma phagocytophilum* and is transmitted to humans through ticks of the genus *Ixodes*. Anaplasmosis shows high clinical variability, with symptoms like headache, fever, chills, malaise, muscle pain, nausea, cough, confusion and rash. If not treated correctly, anaplasmosis can evolve to severe clinical manifestations and even death in <1% of cases.

Q fever is a zoonosis caused by the bacteria *Coxiella burnetii*. Cattle, sheep, and goats are the primary reservoirs of *Coxiella burnetii*, and transmission to humans occurs primarily through inhalation of aerosols from contaminated soil or animal waste, though it can be transmitted through tick bites. Only about 50% of the infected people show clinical symptoms, which are flu-like symptoms such as headache, fever, chills, fatigue, muscle aches, nausea, cough, chest pain and weight loss. In severe cases people may develop pneumonia or hepatitis.



Babesiosis is produced by many species of protozoa of the genus *Babesia*, mainly *Babesia microti* and *Babesia divergens*. Babesiosis is also transmitted by ticks of the genus *Ixodes*, and it is frequently found as a coinfection with Lyme disease. Babesiosis usually shows none or flu-like mild symptoms, such as headache, fever, chills, body aches, loss of appetite, nausea or fatigue. However, since *Babesia* parasites infect and destroy red blood cells, babesiosis can lead to hemolytic anemia.

Ehrlichiosis is due to different species of bacteria of the genus *Ehrlichia*. Causative agents in humans are *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia muris*. Ehrlichiosis is transmitted by the lone star tick (*Amblyomma americanum*). Typical symptoms of ehrlichiosis include headache, fever, chills, malaise, muscle pain, nausea, conjunctival infection, confusion and rash. Severe disease may present lethargy, myalgia, reduction of sodium levels and platelets and elevated liver enzymes, with fatal outcome in 3% of cases.

Tick Borne encephalitis is produced by the Tick Borne encephalitis virus (TBEV) of the family *Flaviviridae*. It is transmitted to humans through ticks of the genus *Ixodes*. The onset of the disease includes nonspecific symptoms such as fever, malaise, anorexia, muscle aches, headache, nausea and vomiting. In 20-30% of patients, a second phase is observed that involves the central nervous system with symptoms of meningitis, encephalitis, or meningoencephalitis, leaving neuropsychiatric sequelae in 10-20% of patients.

Spotted fever is caused by bacteria of the genus *Rickettsia* and is widely distributed by different geographical areas, being able to transmit depending on it by different ticks such as: wood tick, *Dermacentor Andersoni* (in the Rocky Mountain states, USA), dog tick, *Dermacentor variabilis* (other areas of the USA), ticks *Amblyomma cajennense* (in South America) and *Rhipicephalus sanguineus* (in Mexico). Spotted fever is characterized by dark scabs at the site of the tick bite (eschar), accompanied by nonspecific symptoms such as headache, fever, rash and muscle ache.

Since most Tick Borne diseases show similar symptoms, diagnosis can be problematic. Real-time PCR assays have been shown to be a sensitive and specific diagnostic tool for the detection of the causative agent.

### 3. Principle of the procedure

VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of TBEV, *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia muris*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia miyamotoi* and/or *Borrelia hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* and/or *Coxiella burnetii* in clinical samples. The detection of TBEV is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of the 3'UTR sequence of TBEV using specific primers and a fluorescent-labelled probe. After DNA isolation, the identification of rest of pathogens is performed by the amplification of a conserved region of the 23S rRNA gene (*Rickettsia* spp.), *CCT-eta* gene (*Babesia microti*), *hsp70* gene (*Babesia divergens*), *GroEl* gene (*Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia muris*), 23S rRNA gene (*Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia miyamotoi* and/or *Borrelia hermsii*), *msp2* gene (*Anaplasma phagocitophylum*) and *IS1111* gene (*Coxiella burnetii*), using specific primers and a fluorescent-labelled probe.



VIASURE *Tick Borne Diseases* 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 target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Each kit includes three kinds of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *Borrelia burgdorferi s.l.*, *Borrelia miyamotoi* and/or *Borrelia hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* and/or *Coxiella burnetii* (VS-BAC1SL/VS-BAC1SH *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips). *Borrelia burgdorferi s.l.*, *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia hermsii* DNA targets are amplified and detected in FAM channel, *Anaplasma phagocitophylum* DNA targets are amplified and detected in ROX channel, and *Coxiella burnetii* DNA targets are amplified and detected in Cy5 channel. The first strip (VS-BAC1SL/VS-BAC1SH *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips) contains an internal control (IC) which is amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2). The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *Rickettsia* spp., *Babesia microti* and/or *Babesia divergens*, and *Ehrlichia chafeensis* and/or *Ehrlichia muris* (VS-ERB1SL/VS-ERB1SH *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia* 8-well strips). *Rickettsia* spp. DNA targets are amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex. 2), *Babesia microti* and *Babesia divergens* DNA targets are amplified and detected in ROX channel and *Ehrlichia chafeensis* and *Ehrlichia muris* DNA targets are amplified and detected in FAM channel. The third strip contains the monoplex reaction mix for the detection of TBEV (VS-TBE1SL/VS-TBE1SH, *TBEV* 8-well strips). TBEV RNA targets are amplified and detected in FAM channel.

#### 4. Reagents provided

VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1:





Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-BAC1SL/ VS-BAC1SH	<i>Borrelia</i> , <i>Anaplasma</i> & <i>Coxiella</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
VS-ERB1SL/ VS-ERB1SH	<i>Rickettsia</i> , <i>Babesia</i> & <i>Ehrlichia</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
VS-TBE1SL/ VS-TBE1SH	TBEV 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-TBD1C	Tick Borne Diseases Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA/DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	9/18 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-TBD106L, VS-TBD106H, VS-TBD112L and VS-TBD112H.

## 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 *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- RNA/DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

VIASURE *Tick Borne Diseases* 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), 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 intended 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.
- 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.
- Make sure to use a well for determining TBEV, another well for determining *Rickettsia* spp., *Babesia microti/Babesia divergens* and *Ehrlichia chafeensis/Ehrlichia muris* and another well for determining *Borrelia burgdorferi s.l.*, *Borrelia miyamotoi* and/or *Borrelia hermsii*, *Anaplasma phagocitophilum* and/or *Coxiella burnetii*. Be careful not to mix them throughout the process.
- 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.

## 8. Test procedure

### 8.1. Sample preparation

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



For longer storage, the samples should be frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenize sample as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles before isolating nucleic acids should be avoided.

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

Blood samples might be collected using vacutainer system (tubes stabilized with EDTA) and be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for up to one week. Blood components (serum and plasma samples) can be obtained after blood centrifugation and should be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for up to one week or at  $-20^{\circ}\text{C}$  indefinitely. Nucleic acids isolation from whole blood, serum or plasma could be performed using  $100\ \mu\text{L}$  and/or following the recommendations of the manufacturer.

Tissue samples should be collected in a clean container and stored immediately at  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

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

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

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

Synovial fluids (SF) samples from patients with Lyme arthritis could be collected without additives and stored overnight initially at  $4^{\circ}\text{C}$  and then transferred to  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

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

This section summarized a brief description of sample preparation. To perform more suitable sample collection, transport and storage; we suggest following the manufacturer's recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.



### 8.1.1. RNA/DNA extraction

For RNA/DNA extraction from serum, blood, tissue and microbiological culture samples you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available RNA/DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions.

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

### 8.2. Lyophilized positive control

*Tick Borne Diseases 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 *Tick Borne Diseases 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 RNA/DNA extracted from each sample, reconstituted *Tick Borne Diseases 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.

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	Reverse transcription	15 min	45°C
1	Initial denaturation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table 2. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (\*) through the FAM (*Borrelia burgdorferi s.l./Borrelia miyamotoi/Borrelia hermsii* and *Ehrlichia chafeensis/Ehrlichia muris*), HEX, JOE or VIC (*Rickettsia* spp and Internal Control (IC)), ROX (*Babesia microti/Babesia divergens* and *Anaplasma phagocitophylum*), and Cy5 channels (*Coxiella burnetii*). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast 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 negative control well and the presence of signal for *Tick Borne Diseases* Positive Control well. The analysis of the samples is done by the software itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer's instructions.

### Interpretation of results for VS-BAC1SL/VS-BAC1SH *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips:

- A sample is considered positive for ***Borrelia burgdorferi s.l./Borrelia miyamotoi/ Borrelia hermsii*** if there is an amplification signal in FAM channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. 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 positive for ***Anaplasma phagocitophylum*** if there is an amplification signal in ROX channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. 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 positive for ***Coxiella burnetii*** if there is an amplification signal in Cy5 channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of 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.
- The experiment is considered failed if there is an amplification signal in the Negative Control well and/or there is not amplification signal in the Positive Control 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.

Interpretation of results for VS-ERB1SL/VS-ERB1SH *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia* 8-well strips:

- A sample is considered positive for ***Rickettsia spp.*** if there is an amplification signal in HEX/VIC/JOE channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for ***Babesia microti/Babesia divergens*** if there is an amplification signal in ROX channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for ***Ehrlichia chafeensis/Ehrlichia muris*** if there is an amplification signal in FAM channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the internal control of *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* assay is positive.
- The experiment is considered failed if there is an amplification signal in the Negative Control well and/or there is not amplification signal in the Positive Control well. We recommend to repeat the assay again.

Interpretation of results for VS-TBE1SL/VS-TBE1SH TBEV 8-well strips:

- A sample is considered positive for **TBEV** if there is an amplification signal in FAM channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the internal control of *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* assay is positive.
- The experiment is considered failed if there is an amplification signal in the Negative Control well and/or there is not amplification signal in the Positive Control well. We recommend to repeat the assay again.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella*).

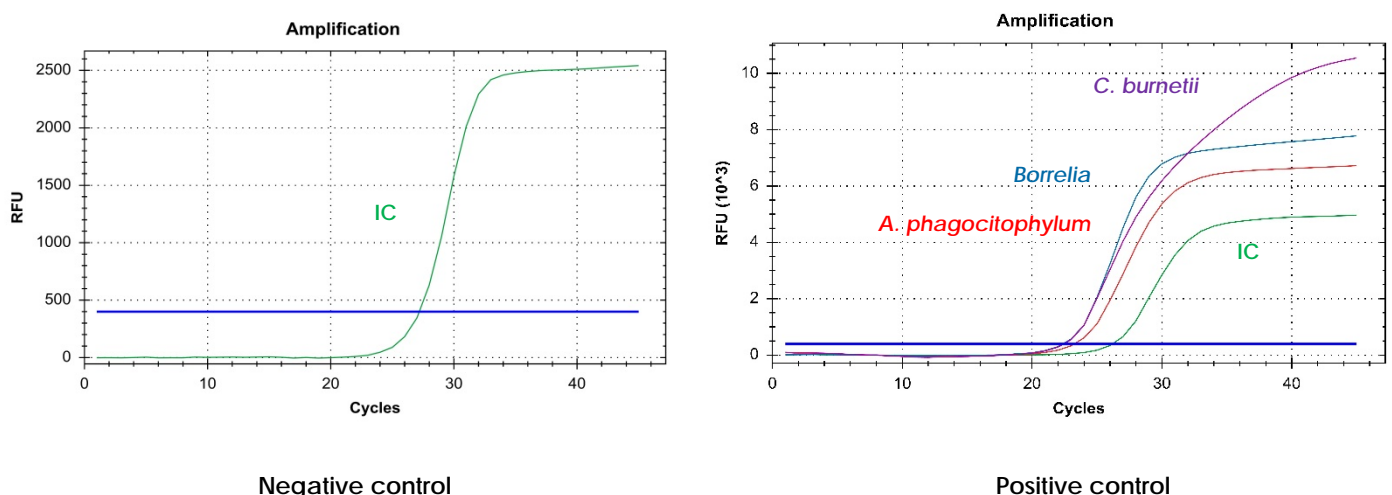


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Rickettsia, Babesia & Ehrlichia*).

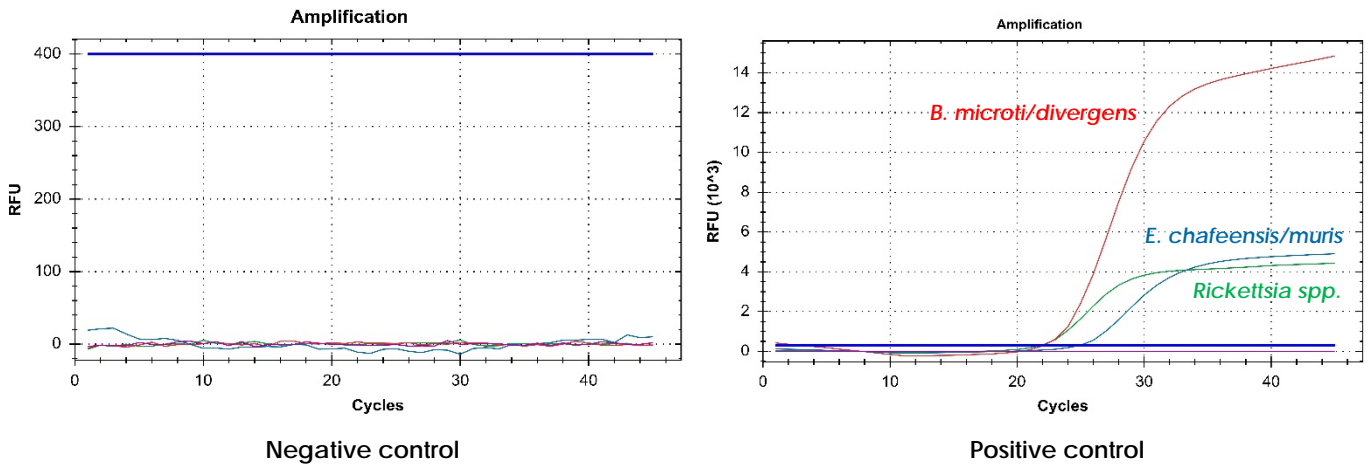
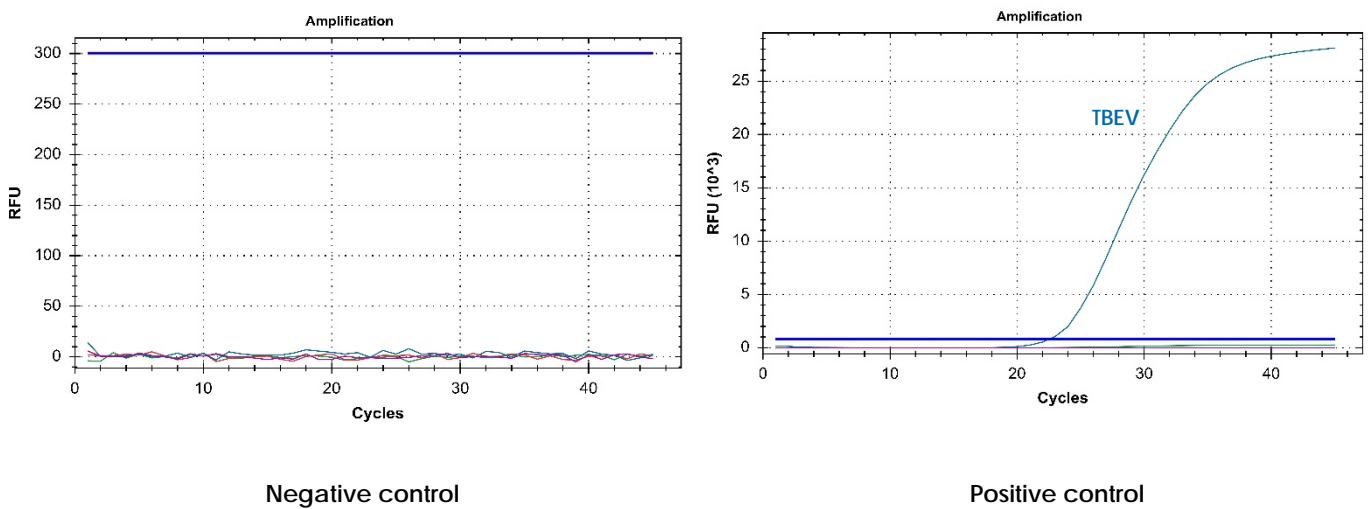


Figure 3. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Monoplex reaction mix TBEV).



## 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 only with RNA/DNA extracted from blood, serum, tissue samples and microbiological culture from ticks, biopsy skin, cerebrospinal fluid (CSF) and synovial fluid.
- 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 contamination by Tick Borne diseases, either samples containing high concentrations of target RNA/DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## 11. Quality control

VIASURE *Tick Borne Diseases* 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 included in the strip 1 (VS-BAC1SL/VS-BAC1SH *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips) confirms the correct performance of the technique.

## 12. Performance characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit for *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strip was tested using 95 DNA samples extracted from microbiological culture from ticks, biopsy skin, cerebrospinal fluid (CSF) and synovial fluid. A total of 17 well characterized *Borrelia* strains comprising 9 different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies, notably *B. japonica* (n=1), *B. burgdorferi* sensu stricto (n=2; B31 and PBr strains), *B. bavariensis* (n=1; PBi strain), *B. garinii* (n=5; PBr, PHei, PWudII, PRef and PLa strains), *B. bissettii* (n=1; PGeb strain), *B. afzelii* (n=2; PKo and PVPM strains), *B. lusitaniae* (n=1; Poti B2strain), *B. spielmanii* (n=1; PSigII strain), *B. valaisiana* (n=1; VS116 strain)) were included. Additionally, two relapsing fever control strains *B. hermsii* (n=1) and *B. miyamotoi* (n=1) were included as well as the potentially cross-reactive spirochaetes *Leishmania* spp. (n=2) and *Treponema* spp. (n=1) were tested. The VIASURE real-time PCR successfully detected all tested *Borrelia* sensu lato genospecies and the relapsing fever group strains *B. hermsii* and *B. miyamotoi*. No cross reactivity was observed with DNA from *Leptospira* and *Treponema* species for VIASURE assay.

VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit for *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strip was evaluated with 3 INSTAND *Coxiella burnetii* & *Bacillus anthracis* panels from 2017 and 2018, as well as, 17 additional tissue samples. The results were compared with the final EQA program reports or with those obtained by a commercial qPCR assay (EXOone *Coxiella burnetii* (EXOPOL)). All *Coxiella burnetii* positive samples (6/12) from 3 INSTAND programs were detected and 15/17 tissue samples showed a positive result in the identification of *Coxiella burnetii*.

The clinical performance of VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit for *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia* 8-well strips and for *TBEV* 8-well strips was evaluated using 90 samples from 16 different QCMD panels (Tropical diseases and borreliosis panels) and 2 clinical specimens (serum and blood). VIASURE assay for *TBEV* 8-well strips found 8/90 positive samples for Tick Borne Encephalitis Virus.

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect *TBEV*, *Rickettsia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia miyamoto* and/or *Borrelia hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* and *Coxiella burnetii* using VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit.



## 12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of  $\geq 10$  RNA/DNA copies per reaction (Figure 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10).

Figure 4. Dilution series of *Borrelia burgdorferi*/*Borrelia miyamotoi*/ *B. hermsii* ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella*, channel FAM)

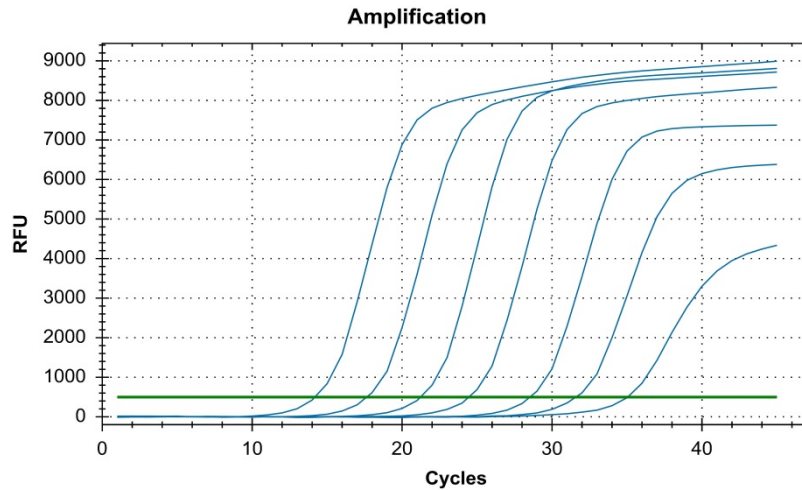


Figure 5. Dilution series of *Anaplasma phagocitophilum* ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella*, channel ROX).

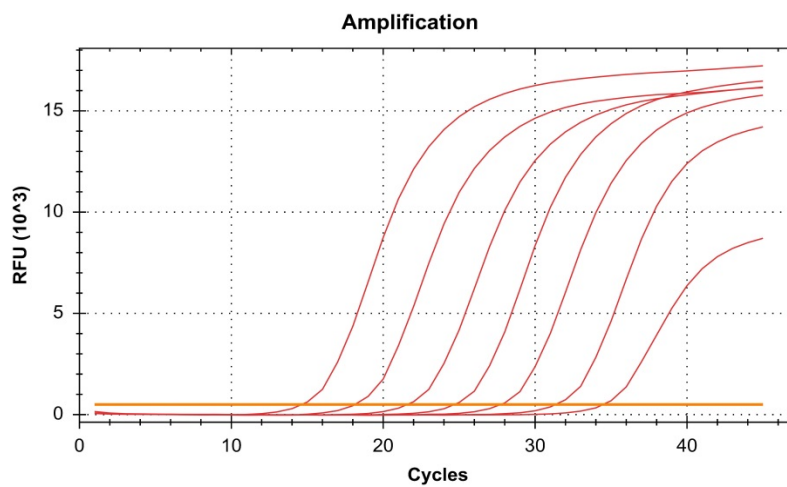




Figure 6. Dilution series of *Coxiella burnetii* ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella*, channel Cy5).

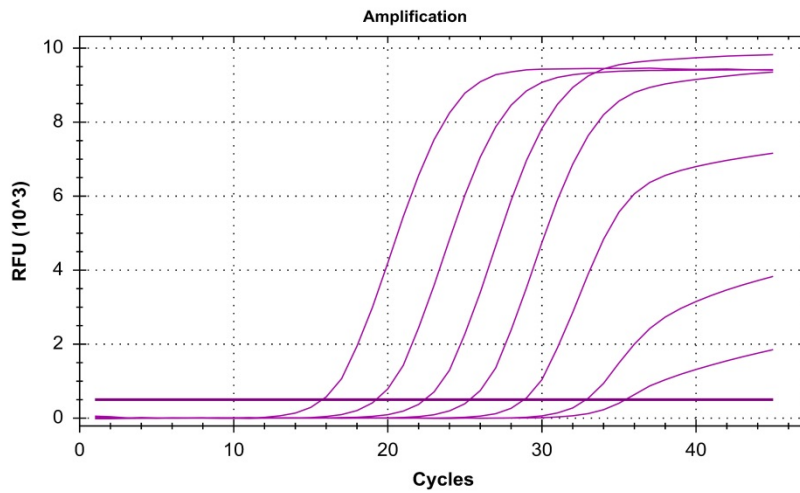


Figure 7. Dilution series of *Rickettsia* spp ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia*, channel HEX).

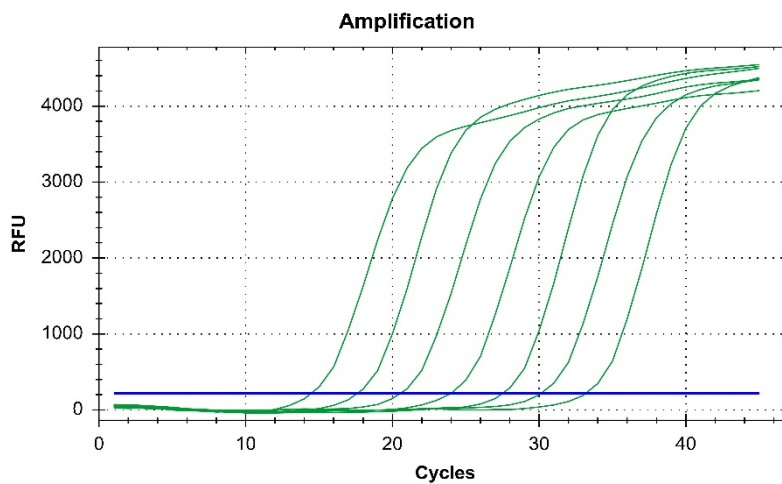


Figure 8. Dilution series of *Babesia microti*/*Babesia divergens* ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia*, channel ROX).

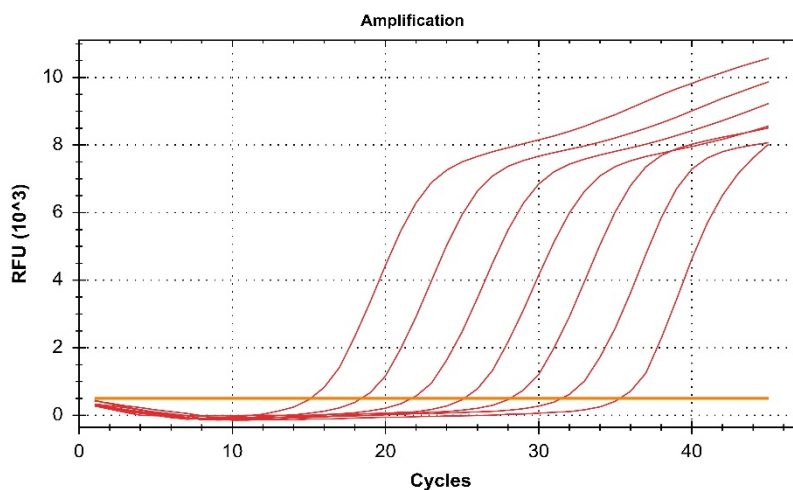


Figure 9. Dilution series of *Ehrlichia chafeensis*/*Ehrlichia muris* ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia*, channel FAM)

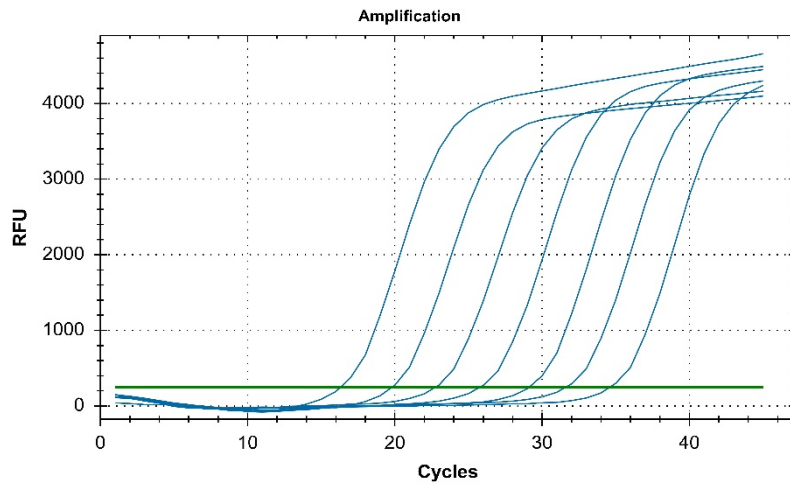
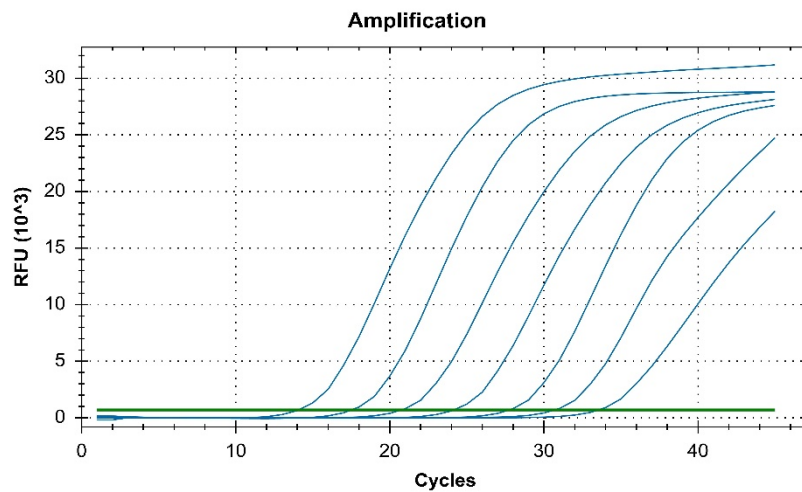


Figure 10. Dilution series of TBEV ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Monoplex reaction mix TBEV, channel FAM).



### 12.3. Analytical specificity

The specificity of the Tick Borne Diseases assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common Tick Borne pathogens. No cross-reactivity was detected against any of the following microorganisms tested:



Cross-reactivity testing			
<i>Anaplasma marginale</i>	-	<i>Borrelia garinii</i>	-/+
<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-/+	<i>Borrelia japonica</i>	-/+
<i>Borrelia hermsii</i>	-/+	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-/+
<i>Borrelia lusitanae</i>	-/+	<i>Borrelia spielmanii</i>	-/+
<i>Borrelia valaisiana</i>	-/+	<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-/+
<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-/+	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-/+	<i>Rickettsia conorii</i> . strain Moroccan	-/+
<i>Borrelia bisetti</i>	-/+	<i>Leptospira</i>	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto-strain IRS	-/+	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto strain B31	-/+	Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV) strain Neudorfl	-/+

Table 3. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

#### 12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against TBEV strain Neudorfl, *Rickettsia coronii* strain Moroccan, synthetic sequence of *Babesia microti*, synthetic sequence of *Babesia divergens*, synthetic sequence of *Ehrlichia chafeensis*, synthetic sequence of *Ehrlichia muris*, *Borrelia azfeli* (P-Ko/1984 and PVPM strains), *Borrelia bavariensis* (PBi strain), *Borrelia bisettii* (PGeb strain), *Borrelia bisettiae*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (B31, IRS and PBre strains), *Borrelia garinii* (PHei, PWudII, PRef and PLa strains) and *Borrelia garinii* *OspA* *Typ3* strains, *B. japonica*, *B. lusitanae* (Poti B2 strain), *B. spielmanii* (PSigII strain), *Borrelia valaisiana* (VS116 strain), *B. hermsii* and *B. miyamotoi*, *Anaplasma phagocitophylum* and *Coxiella burnetii* strain Nine Mile Q showing positive results.



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 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
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 Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup>
Cepheid	SmartCycler® <sup>(3)</sup>
Qiagen	Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
Roche	Cobas z480 Analyzer <sup>(4)</sup>

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

(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, section 8.3) and transferred into the specific tubes designed to perform on Rotor-Gene® Q or SmartCycler® instruments.  
 (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	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	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	
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".

Universal exposition values are as follow:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -1000, 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.

For "VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit", it is recommend set the exposition values as follow:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -1000, 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 - 150, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel – 100.



## ESPAÑOL

### 1. Uso previsto

VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de RNA viral o DNA genómico específico para el virus Tick Borne Encephalitis (TBEV), *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chafeensis*, *Ehrlichia muris*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), *Borrelia miyamotoi* y/o *B. hermsii*, *Anaplasma phagocitophilum* y/o *Coxiella burnetii* en sangre, suero, muestras de tejido y cultivo microbiológico de garrapatas, biopsias cutáneas, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido sinovial procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección transmitida por garrapatas. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de las enfermedades transmitidas por garrapatas en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA/DNA es extraído a partir de las muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar TBEV, *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chafeensis*, *Ehrlichia muris*, *B. Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), *Borrelia miyamotoi* y *B. hermsii*, *Anaplasma phagocitophilum* y *Coxiella burnetii*.

### 2. Introducción y explicación

Las enfermedades transmitidas por garrapatas comprenden un grupo de infecciones transmitidas a humanos a través de garrapatas infectadas con bacterias, virus o parásitos. Las enfermedades transmitidas por garrapatas que afectan a humanos son: enfermedad de Lyme, fiebre recurrente transmitida por garrapatas, babesiosis, anaplasmosis, ehrlichiosis, fiebre Q, encefalitis transmitida por garrapata y fiebre manchada, entre otros.

La enfermedad de Lyme (o borreliosis de Lyme) es la enfermedad transmitida por garrapatas más común en todo el mundo. Está causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* y se transmite a los humanos a través de la picadura de garrapatas de patas negras infectadas del género *Ixodes*. Los síntomas típicos de la enfermedad de Lyme son fiebre, dolor de cabeza, fatiga y una erupción cutánea característica llamada eritema migratorio. Si no se trata, la infección puede extenderse a las articulaciones, el corazón y el sistema nervioso.

*Borrelia miyamotoi* y *B. hermsii* son especies de bacterias en forma de espiral que están relacionadas con las bacterias que causan fiebre recurrente transmitida por garrapatas (TBRF). Estas especies fueron identificadas por primera vez en 1995 en Japón, *B. miyamotoi* se ha detectado en diferentes especies de garrapatas *Ixodes*, mientras que la espiroqueta *B. hermsii* se transmite por garrapatas de la familia *Argasidae*, *Ornithodoros hermsi*. Los pacientes infectados suelen presentar frecuentemente fiebre, escalofríos y dolor de cabeza. Otros síntomas comunes son fatiga, artralgia y mialgia.

La anaplasmosis está causada por la bacteria *Anaplasma phagocytophilum* y se transmite a humanos a través de garrapatas del género *Ixodes*. La anaplasmosis muestra una gran variabilidad clínica, con síntomas como dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, malestar general, dolor muscular, náuseas, tos, confusión y erupciones. Si no se trata correctamente, la anaplasmosis puede evolucionar a manifestaciones clínicas más graves e incluso la muerte en <1% de los casos.



La fiebre Q es una zoonosis causada por la bacteria *Coxiella burnetii*. Vacas, ovejas y cabras son el reservorio primario de *Coxiella burnetii*, y su transmisión a humanos tiene lugar principalmente a través de la inhalación de aerosoles que pueden contener residuos animales, aunque también puede transmitirse por picaduras de garrapata. Sólo en torno un 50% de las personas infectadas muestran sintomatología, similar a un síndrome gripal con dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, fatiga, dolores musculares, náusea, tos, dolor de pecho y pérdida de peso. En casos graves se puede desarrollar neumonía o hepatitis.

La babesiosis está producida por diferentes especies de protozoos del género *Babesia*, principalmente *Babesia microti* y *Babesia divergens*. La babesiosis también se transmite por garrapatas del género *Ixodes*, y aparece frecuentemente como coinfección con la enfermedad de Lyme. Normalmente no produce sintomatología o presenta síntomas gripales, como dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, dolor generalizado, pérdida de apetito, náusea o fatiga. Sin embargo, debido a que estos parásitos infectan y destruyen las células rojas sanguíneas, la babesiosis puede producir además anemia hemolítica.

La ehrlichiosis es debida a diferentes especies de bacterias del género *Ehrlichia*. Los agentes causales en humanos son *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia muris*. La ehrlichiosis se transmite por la garrapata estrella solitaria (*Amblyomma americanum*). Los síntomas típicos de ehrlichiosis incluyen dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, malestar, dolor muscular, náusea, conjuntivitis, confusión y sarpullidos. En casos graves pueden aparecer letargia, mialgia, reducción de los niveles de sodio y de plaquetas y niveles altos de enzimas hepáticas, pudiendo ser fatales en un 3% de casos.

La encefalitis transmitida por garrapatas se produce por el virus *Tick Borne encephalitis* (TBEV) de la familia *Flaviviridae*. Se transmite a humanos a través de garrapatas del género *Ixodes*. El debut de la enfermedad incluye síntomas no específicos como fiebre, malestar, anorexia, dolores musculares, dolor de cabeza, náuseas y vómitos. Un 20-30% de pacientes presenta una segunda fase que afecta al sistema nervioso central produciendo meningitis, encefalitis, o meningoencefalitis; dejando secuelas neuropsiquiátricas en un 10-20% de pacientes.

La fiebre manchada está causada por bacterias del género *Rickettsia*, está ampliamente distribuida por diferentes áreas geográficas, pudiéndose transmitir en función de ésta por diferentes garrapatas como: la garrapata de la madera, *Dermacentor Andersoni* (Montañas Rocosas de los EE.UU), la garrapata de los perros, *Dermacentor variabilis* (otras zonas de EE.UU), las garrapatas *Amblyomma cajennense* (en América del Sur) y *Rhipicephalus sanguineus* (en México). La fiebre maculosa se caracteriza por costras oscuras en la zona de la picadura (escaras), acompañadas de síntomas inespecíficos como dolor de cabeza, fiebre, sarpullido y dolor muscular.

Dado que la mayoría de las enfermedades transmitidas por garrapatas muestran síntomas comunes, el diagnóstico puede ser problemático. La PCR a Tiempo Real es una de las herramientas diagnósticas más sensibles y específicas para la detección del agente causal de estas enfermedades.

### 3. Procedimiento

VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de TBEV, *Rickettsia* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia muris*, *Borrelia burgdorferi* (s.l.), *Borrelia*



*miyamotoi* y/o *B. hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* y/o *Coxiella burnetii* en muestras clínicas. La detección de TBEV se realiza a través de la retrotranscripción en un solo paso y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa seguida de la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada de la secuencia 3'UTR del TBEV. Tras el aislamiento del DNA, se produce la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada del gen 23S rRNA (*Rickettsia spp.*), el gen *CCT-eta rRNA* (*Babesia microti*) el gen *hsp70* (*Babesia divergens*), el gen *GroEl* (*Ehrlichia chafeensis* y *Ehrlichia muris*), el gen 23S rRNA (*Borrelia burgdorferi s.l.*, *Borrelia miyamotoi* y *B. hermsii*), el gen *msp2* (*Anaplasma phagocitophylum*) y el gen *IS1111* (*Coxiella burnetii*).

VIASURE Tick Borne Diseases 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 DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Cada kit incluye tres tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Borrelia burgdorferi (s.l.)*, *Borrelia miyamotoi* y *B. hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* y *Coxiella burnetii* (VS-BAC1SL/VS-BAC1SH *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips). Tras la reacción de amplificación *Borrelia burgdorferi s.l.* y *Borrelia miyamotoi* se detecta en el canal FAM, *Anaplasma phagocitophylum* se detecta en el canal ROX, *Coxiella burnetii* se detecta en el canal Cy5 y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2). La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Rickettsia spp.*, *Babesia microti* y/o *Babesia divergens* y *Ehrlichia chafeensis* y/o *Ehrlichia muris* (VS-ERB1SL/VS-ERB1SH *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia* 8-well strips). Tras la reacción de amplificación, *Rickettsia spp* se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2), *Babesia microti* y *Babesia divergens* se detectan en el canal ROX y *Ehrlichia chafeensis* y *Ehrlichia muris* se detectan en el canal FAM. La tercera tira contiene la mezcla de reacción monoplex para la detección de TBEV. (VS-TBE1SL/VS-TBE1SH TBEV 8-well strips). Tras la reacción de amplificación, TBEV se detecta en el canal FAM.

#### 4. Reactivos suministrados

VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1:



Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-BAC1SL/ VS-BAC1SH	<i>Borrelia, Anaplasma &amp; Coxiella</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
VS-ERB1SL/ VS-ERB1SH	<i>Rickettsia, Babesia &amp; Ehrlichia</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
VS-TBE1SL/ VS-TBE1SH	TBEV 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-TBD1C	<i>Tick Borne Diseases</i> Positive Control	cDNA/DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-TBD106L, VS-TBD106H, VS-TBD112L y VS-TBD112H.

## 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 *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de RNA/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.

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

## 8. Procedimiento del test

### 8.1. Preparación de la muestra

Una adecuada recolección y transporte de las muestras clínicas es fundamental para el aislamiento, la identificación y la caracterización de los patógenos. Los especímenes (garrapatas, sangre, suero, muestras de tejido, biopsia cutánea, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido sinovial) deben ser recolectados adecuadamente en un área limpia y procesados tan pronto como sea posible, para evitar la pérdida de viabilidad de los agentes etiológicos y permitir el crecimiento adecuado en el cultivo microbiológico y/o para evitar la degradación de los ácidos nucleicos, así como para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas o que hayan sido inmediatamente congeladas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras deben congelarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente hasta alcanzar temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Deben evitarse los ciclos de congelación y descongelación antes del aislamiento de los ácidos nucleicos.

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

Las **muestras de sangre** pueden ser recolectadas usando un sistema Vacutainer® (con EDTA como estabilizador) y almacenarse posteriormente a  $4^{\circ}\text{C}$  durante una semana. Diferentes componentes sanguíneos (**suero y plasma**) se pueden obtener tras la centrifugación de una muestra de sangre, tras lo cual deben almacenarse a  $4^{\circ}\text{C}$  durante una semana o a  $-20^{\circ}\text{C}$  indefinidamente. El posterior aislamiento de ácidos nucleicos a partir de sangre completa, suero o plasma se puede llevar a cabo utilizando un volumen de  $100\ \mu\text{L}$  y/o siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las **muestras de tejido** deberían recogerse en un recipiente limpio y almacenarse inmediatamente hasta su uso a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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

Para las **biopsias cutáneas**, se debe identificar el borde periférico de la lesión cutánea y en condiciones estériles se toma una biopsia de 4 mm de diámetro con un punch que recoja estos márgenes periféricos de la lesión. Posteriormente, las muestras deben almacenarse inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para el aislamiento de los microorganismos, cada biopsia cutánea se colocaría en un tubo de poliestireno que contenga 6 ml de medio de cultivo sin antibióticos y se incubará a la temperatura adecuada y durante el tiempo necesario. Si el tejido se



preserva en medio BSK durante más de 24 horas, algunas espiroquetas podrían haber migrado de la biopsia cutánea al medio de cultivo. En este caso, el DNA debe prepararse a partir de la biopsia de piel y del medio de cultivo.

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

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

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

Esta sección es una breve descripción de la preparación de las muestras. Para realizar una recolección, transporte y almacenamiento de muestras más adecuados; se sugiere seguir las recomendaciones del fabricante que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

### 8.1.1. Extracción de RNA/DNA

Para la extracción de RNA/DNA a partir de muestras de sangre, suero, tejido y cultivos microbiológicos puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de RNA/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.
- ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

### 8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Tick Borne Diseases* 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 *Tick Borne Diseases* 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 RNA/DNA extraído de cada muestra, de *Tick Borne Diseases* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

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	Retrotranscripción	15 min	45°C
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 2. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (\*) a través de los canales FAM (TBE; *Borrelia burgdorferi* s.l./*Borrelia miyamotoi*; y *Ehrlichia chafeensis*/*Ehrlichia muris*), HEX, JOE o VIC (*Rickettsia* spp y Control Interno), ROX (*Babesia microti*/*Babesia divergens* y *Anaplasma phagocitophilum*) y Cy5 (*Coxiella burnetii*). 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 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 enfermedades transmitidas por garrapatas. 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.

Interpretación de los resultados para VS-BAC1SL/VS-BAC1SH *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips:



- Una muestra se considera positiva para *Borrelia burgdorferi s.l./Borrelia miyamotoi* si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal de amplificación. 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 positiva para *Anaplasma phagocitophilum* si muestra señal de amplificación en el canal ROX y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal de amplificación. 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 positiva para *Coxiella burnetii* si muestra señal de amplificación en el canal Cy5 y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.
- Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta.
- El experimento se considera fallido si muestra señal de amplificación en el control negativo y/o no presenta señal de amplificación en el 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.

Interpretación de los resultados para VS-ERB1SL/VS-ERB1SH *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia* 8-well strips:

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

Interpretación de los resultados para VS-TBE1SL/VS-TBE1SH TBEV 8-well strips:

- Una muestra se considera positiva para **TBEV** si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40.



- Una muestra se considera negativa, si la muestra no muestra señal de amplificación en el sistema de detección, pero el control interno del ensayo de *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* es positivo.
- El experimento se considera fallido si muestra señal de amplificación en el control negativo y/o no presenta señal de amplificación en el control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

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 (Multiplex reaction mix *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella*).

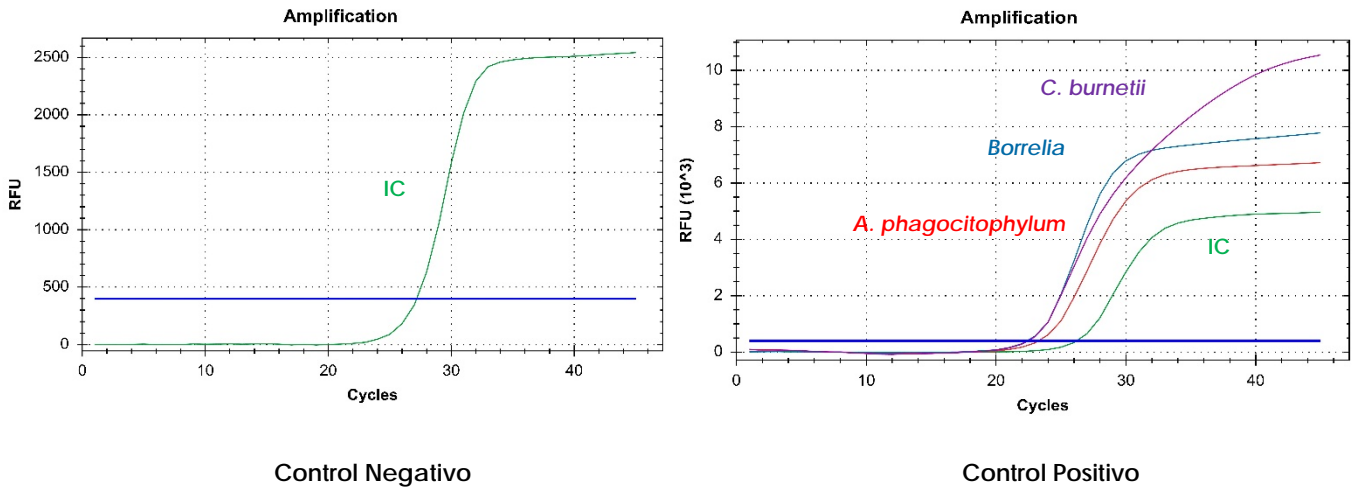


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia*).

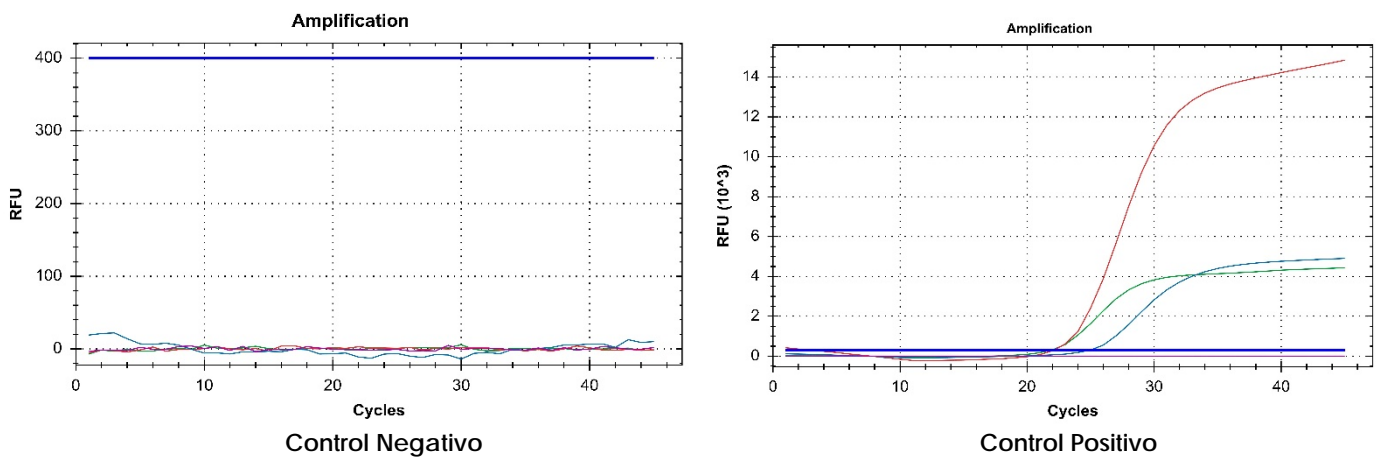
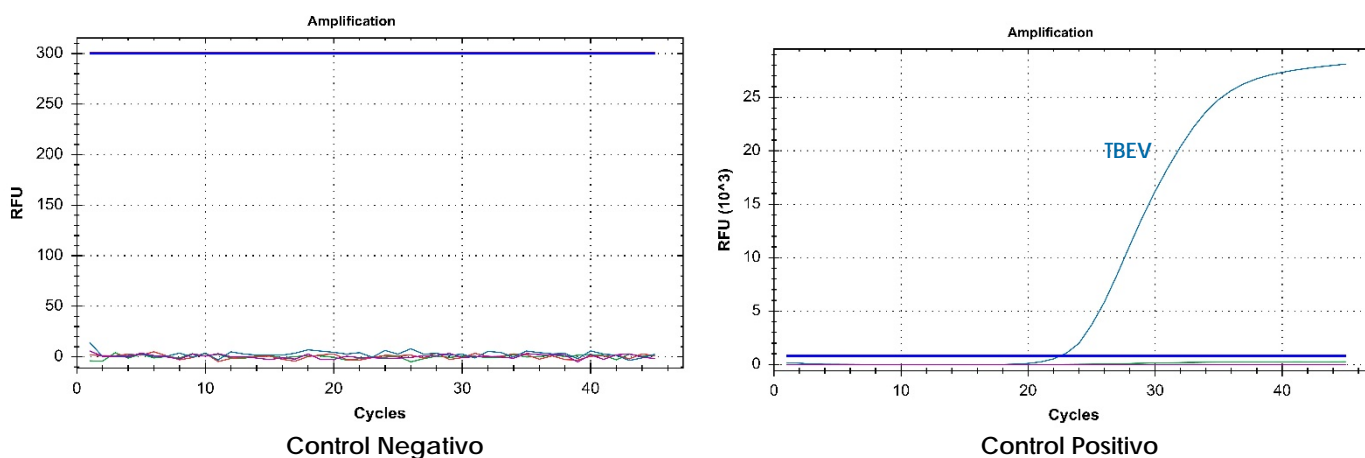




Figura 3. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Monoplex reaction mix TBEV).



## 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 RNA/DNA extraído de muestras de sangre, suero, tejido y cultivos microbiológicos a partir de garrapatas, biopsia cutánea, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido sinovial.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe 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 patógenos transmitidos por garrapatas, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA/DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

## 11. Control de calidad

VIASURE Tick Borne Diseases 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 incluido en la tira 1 (VS-BAC1SL/VS-BAC1SH *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strips) confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

## 12. Características del test

### 12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 95 muestras de DNA extraído de cultivo microbiológicos a partir de garrapatas, biopsia cutánea, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido sinovial, con el ensayo *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella* 8-well strip utilizando



VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit. Un total de 17 cepas de *Borrelia* bien caracterizadas que comprenden 9 genoespecies de *Borrelia burgdorferi* sensu lato diferentes fueron evaluadas, en particular se incluyeron *B. japonica* (n=1), *B. burgdorferi* sensu stricto (n=2; cepas B31 y PBre), *B. bavariensis* (n=1; cepa PBi), *B. garinii* (n=5; PBr, cepas PHei, PWudII, PRef y PLa), *B. bissettii* (n=1; cepa PGeb), *B. afzelii* (n=2; cepas PKo y PVPM), *B. lusitanae* (n=1; cepa Poti B2), *B. spielmanii* (n=1; cepa PSigII), *B. valaisiana* (n=1; cepa VS116)). Además, se testaron dos cepas control de la fiebre recurrente, *B. hermsii* (n=1) and *B. miyamotoi* (n=1) y espiroquetas que podrían causar reacción cruzada como *Leishmania* spp. (n = 2) y *Treponema* spp. (n = 1). La PCR en tiempo real VIASURE detectó con éxito todas las genoespecies de *Borrelia* sensu lato probadas y las cepas del grupo de fiebre recurrente *B. hermsii* y *B. miyamotoi*. No se observó reactividad cruzada con el DNA de las especies de *Leptospira* y *Treponema*.

El ensayo *Borrelia, Anaplasma & Coxiella* 8-well strip del test VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit se evaluó con 3 paneles de INSTAND *Coxiella burnetii* & *Bacillus anthracis* de 2017 y 2018, y con 17 muestras de tejido adicionales. Los resultados se compararon con los informes finales de los programas EQA ó con un ensayo comercial basado en la tecnología PCR a Tiempo Real (EXOone *Coxiella burnetii* (EXOPOL)). Todas las muestras de *Coxiella burnetii* positivas (6/12) de los 3 programas INSTAND fueron detectadas y en 15/17 muestras de tejidos se identificaron como positivas para *Coxiella burnetii*.

Se evaluaron 90 muestras procedentes de 15 paneles QCMD diferentes (paneles de enfermedades tropicales y Borreliosis) y 2 muestras clínicas (suero y sangre) con los ensayos *Rickettsia, Babesia & Ehrlichia* 8-well strips y *TBEV* 8-well strips utilizando VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit. El ensayo VIASURE TBEV identificó 8/90 muestras positivas para Tick Borne Encephalitis Virus.

En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar TBEV, *Rickettsia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia miyamoto* y/o *Borrelia hermsii*, *Anaplasma phagocitophylum* y *Coxiella burnetii* utilizando Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit.

## 12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de RNA/DNA por reacción (Figura 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10).

Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar de *Borrelia burgdorferi*/*Borrelia miyamotoi*/ *B. hermsii* ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Borrelia, Anaplasma & Coxiella*, canal FAM).

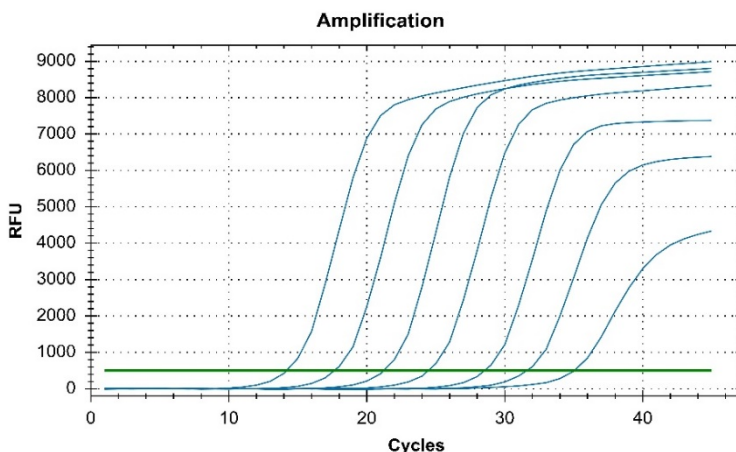


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar de *Anaplasma phagocitophilum* ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella*, canal ROX).

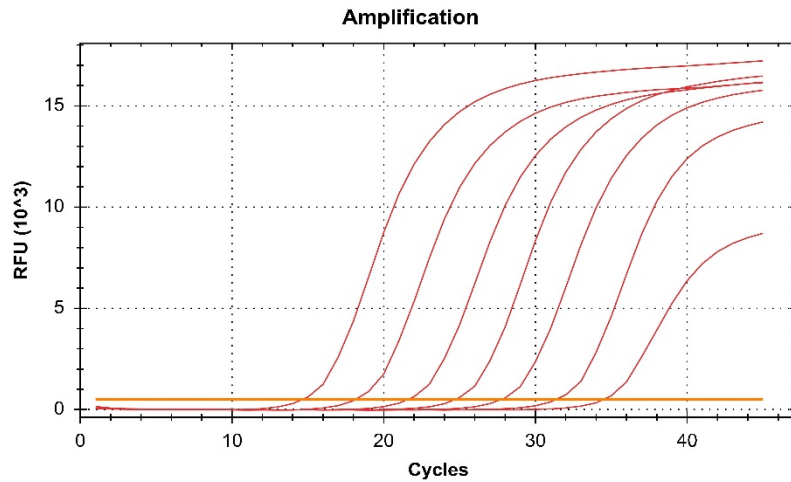


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar de *Coxiella burnetii* ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Borrelia*, *Anaplasma* & *Coxiella*, canal Cy5).

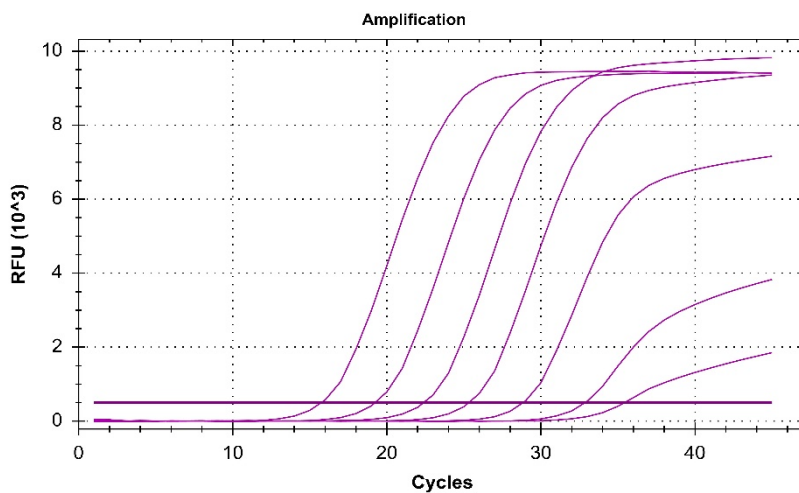


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar de *Rickettsia* spp. ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Rickettsia*, *Babesia* & *Ehrlichia*, canal HEX).

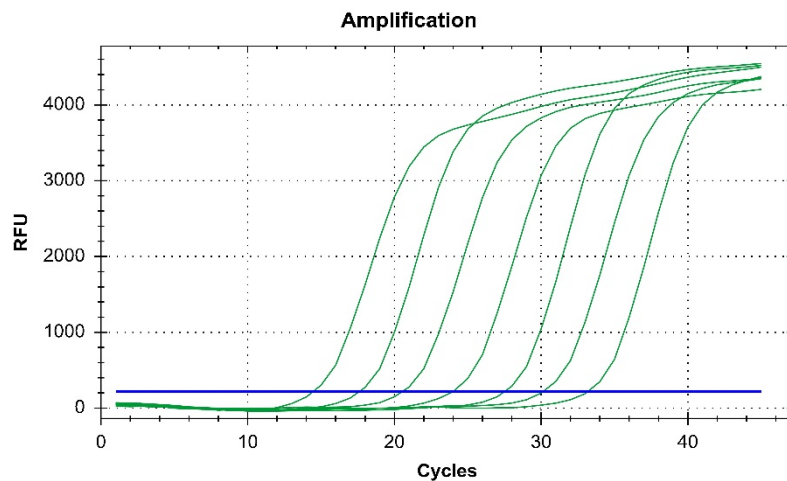


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar de *Babesia microti/Babesia divergens*. ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Rickettsia, Babesia & Ehrlichia*, canal ROX).

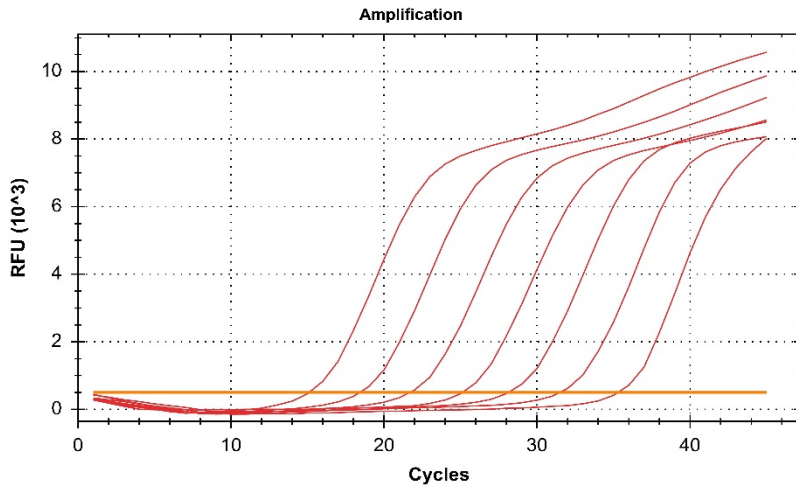


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar de *Ehrlichia chafeensis/Ehrlichia muris*. ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Rickettsia, Babesia & Ehrlichia*, canal FAM).

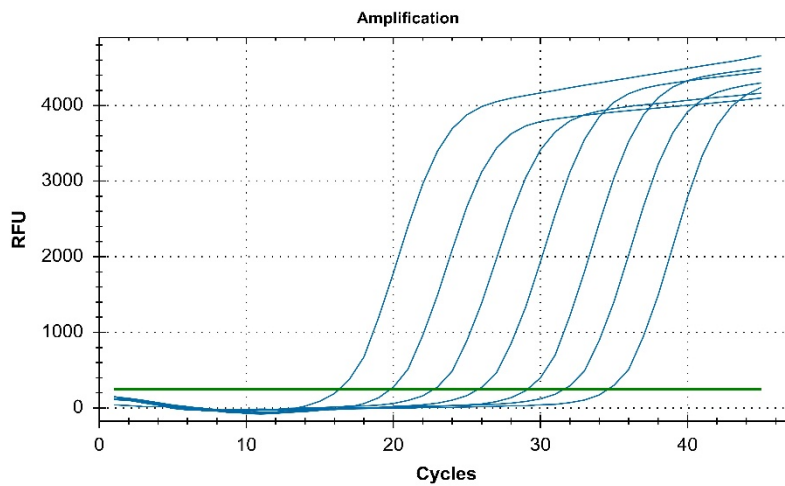
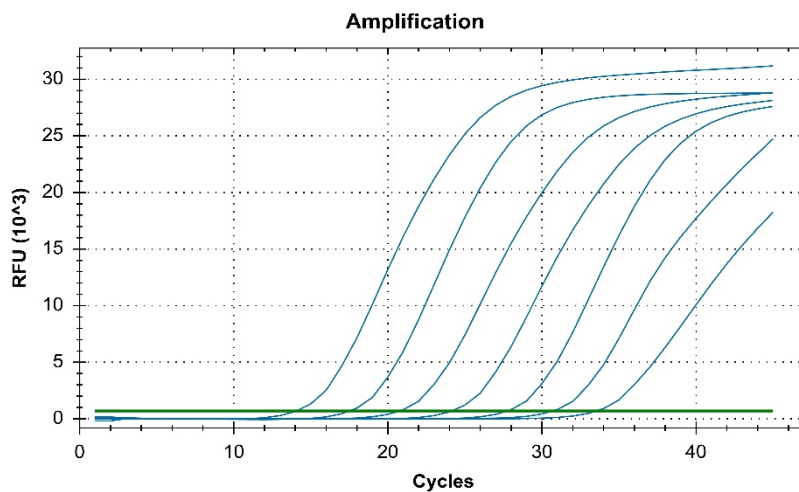


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de TBEV ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción monoplex TBEV, canal FAM).



### 12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de enfermedades transmitidas por garrapatas fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos transmitidos por garrapatas más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reacción cruzada			
<i>Anaplasma marginale</i>	-	<i>Borrelia garinii</i>	-/+
<i>Bartonella henselae</i> cepa Houston-1	-/+	<i>Borrelia japonica</i>	-/+
<i>Borrelia hermsii</i>	-/+	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-/+
<i>Borrelia lusitanae</i>	-/+	<i>Borrelia spielmanii</i>	-/+
<i>Borrelia valaisiana</i>	-/+	<i>Coxiella burnetii</i> cepa Nine Mile Q	-/+
<i>Borrelia azfели</i> cepa P-Ko/1984	-/+	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-/+	<i>Rickettsia conorii</i> . cepa Moroccan	-/+
<i>Borrelia bissetti</i>	-/+	<i>Leptospira</i>	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto-cepa IRS	-/+	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto cepa B31	-/+	Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV) cepa Neudorfl	-/+

Tabla 3. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

### 12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a TBEV cepa Neudorfl, *Rickettsia coronii* strain Moroccan, secuencia sintética de *Babesia microti*, secuencia sintética de *Babesia divergens*, secuencia sintética de *Ehrlichia chafeensis*, secuencia sintética de *Ehrlichia muris*, *Borrelia azfели* (cepas P-Ko/1984 y PVPM), *Borrelia bavariensis* (cepa PBi), *Borrelia bissetti* (cepa PGeb), *Borrelia bissettiae*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (cepas B31, IRS y PBr), *Borrelia garinii* (cepas PHei, PWudII, PRef y PLa) y *Borrelia garinii* cepas *OspA Typ3*, *B. japonica*, *B. lusitanae* (cepa Poti B2), *B. spielmanii* (cepa PSigII), *Borrelia valaisiana* (cepa VS116), *B. hermsii* y *B. miyamotoi*, *Anaplasma phagocitophyllum* y *Coxiella burnetii* cepa Nine Mile Q, mostrando un resultado positivo.











## 13. Bibliography/Bibliografía

1. V. Parikh *et al.* Infections of the nervous system. *International Journal of Critical Illness and Injury Science* 2012; 2(2): 82-97.
2. J. Brites-Neto *et al.* Tick Borne infections in human and animal population worldwide. *Veterinary World* 2015, 8(3):301-315.
3. J.J. Sormunen *et al.* Tick-borne bacterial pathogens in southwestern Finland. *Parasit Vectors*. 2016; 9: 168.
4. M.P. Nelder *et al.* Human pathogens associated with the blacklegged tick *Ixodes scapularis*: a systematic review. *Parasites & Vectors* 2016; 9:265
5. L. Michelet *et al.* High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2014; 4:103.



6. M.A. Diuk-Wasser *et al.* Coinfection by the Tick Borne pathogens *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi*: ecological, epidemiological and clinical consequences. *Trends in Parasitology* 2016; 32(1): 30–42.
7. M. Schwaiger *et al.* Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology* 2003; 27(2): 136-145.
8. C.Y. Kato *et al.* Assessment of Real-Time PCR Assay for Detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in Banked Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(1): 314-317.
9. J. Liu *et al.* Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness, Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2016; 54(1): 49-58.
10. Centers for Disease Control and Prevention ([https://www.cdc.gov/niosh/topics/Tick Borne/](https://www.cdc.gov/niosh/topics/Tick%20Borne/))
11. World Health Organization (<http://www.who.int/en/>).

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

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></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 &lt;n&gt; test Contiene &lt;n&gt; 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 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
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 Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup>
Cepheid	SmartCycler® <sup>(3)</sup>
Qiagen	Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
Roche	Cobas z480 Analyzer <sup>(4)</sup>

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

(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, sección 8.3) y transvasar a los tubos específicos diseñados para emplearse con los instrumentos 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	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	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	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	
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".

Los valores de exposición universales son los siguientes:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -1000, 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.

Para "VIASURE *Tick Borne Diseases* Real Time PCR Detection Kit", se recomienda ajustar los valores de exposición de la siguiente manera:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -1000, 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 -150, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 100.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, 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.















**CerTest Biotec, S.L.**

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1  
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)  
[www.certest.es](http://www.certest.es)



VIASURE online

Distributed by Abacus dx

1800 ABACUS (AUS) 0800 222 170 (NZ) | [info@abacusdx.com](mailto:info@abacusdx.com) | [www.abacusdx.com](http://www.abacusdx.com)

abacus dx