

AMPLIRUN® TOTAL MTB RIF RESISTANT CONTROL (SPUTUM)

Usage *in vitro* uniquement

MBTC014 : Formulation de cellules de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) inactivées résistant à la rifampicine afin de reproduire le prélèvement de crachat humain et tentative de validation et de contrôle du traitement des échantillons, analyse et détection des acides nucléiques lors d'essais fondés sur l'identification de mutations génétiques associées à MTB résistant à la rifampicine, en utilisant le produit comme un contrôle externe.

INTRODUCTION :

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie bacillaire acido-résistante strictement aérobie, non chromogène, à croissance lente. Les humains constituent l'unique réservoir de *Mycobacterium tuberculosis*, un pathogène obligatoire transmis par des particules en suspension dans l'air et qui peut rester latent pendant des années avant de provoquer une tuberculose active.

CARACTÉRISTIQUES DE LA TROUSSE :

Le contenu est lyophilisé. Il doit être reconstitué avant utilisation (voir « Préparation des réactifs »). Les composants Total Control sont destinés à un seul usage. Le matériel non utilisé doit être éliminé. La détection des acides nucléiques nécessite une étape d'extraction permettant la libération de l'ADN/ARN pour l'amplification et la détection.

Description du produit :

MTB: Culture sur des milieux de culture à base de bouillon Middlebrook 7H9. Une fois purifiées, les cellules sont inactivées, ce qui les rend non infectieuses, et diluées dans une matrice de crachat humain.

COMPOSITION DU COFFRET :

1 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (531) CONTROL (SPUTUM): 5 flacons avec cellules lyophilisées de *Mycobacterium tuberculosis* (20 000-50 000 copies/flacon) contenant une mutation rpoB (S531L) qui confère une résistance à la rifampicine. La concentration du lot est indiquée dans le Certificat d'analyse.

2 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (526) CONTROL (SPUTUM): 5 flacons avec cellules lyophilisées de *Mycobacterium tuberculosis* (20 000-50 000 copies/flacon) contenant une mutation rpoB (H526D) qui confère une résistance à la rifampicine. La concentration du lot est indiquée dans le Certificat d'analyse.

La quantification de *Mycobacterium tuberculosis* a été effectuée par le comptage d'unités formant colonies sur des plaques de gélose Middlebrook.

La validation de la quantification a été réalisée par une PCR en temps réel.

Matériel nécessaire non fourni :

Eau pour biologie moléculaire
Kit de extraction et diagnostic complémentaire

CONSERVATION :

Aucune condition particulière de transport n'est nécessaire. Conserver l'ampoule sous forme lyophilisée à 2-8 °C. Après reconstitution, la suspension doit être utilisée le jour même. Le produit non utilisé doit être éliminé.

STABILITÉ ET MANIPULATION DES RÉACTIFS :

Utiliser tous les réactifs dans des conditions aseptiques afin d'éviter toute contamination microbienne. N'utiliser que la quantité de réactif nécessaire à la réalisation de l'essai.

Le produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette à condition de suivre le mode d'emploi.

VIRCELL, S.L. dégage toute responsabilité en cas d'utilisation inappropriée des réactifs contenus dans le kit.

RECOMMANDATIONS ET PRÉCAUTIONS :

1. Ce produit est destiné uniquement au diagnostic *in vitro* et à un personnel qualifié.
2. L'utilisation de pointes de pipette à filtre est essentielle pour éviter toute contamination.
3. Les échantillons doivent être traités comme s'ils étaient infectieux en respectant les procédures de sécurité du laboratoire. Maintenir toutes les surfaces de travail propres et désinfectées à l'aide d'une solution fraîchement préparée d'hypochlorite de sodium à 0,5% dans de l'eau déionisée ou distillée.
4. Pour la réalisation du test, il est essentiel de disposer de zones de travail indépendantes.
5. Tout le matériel non utilisé doit être éliminé conformément à la réglementation applicable.
6. El composant VIRCELL TOTAL CONTROL pourra contenir du matériel génétique ou des substances d'origine animale et/ou humaine. VIRCELL TOTAL CONTROL pourra contenir un antigène inactivé, toutefois, il doit être considéré potentiellement infectieux et manipulé avec précaution. L'inactivation a été vérifiée par l'absence de croissance dans les mêmes conditions de culture utilisées pour chaque microorganisme. Aucune méthode actuelle ne peut garantir complètement l'absence d'agents infectieux. Tout le matériel doit être manipulé et éliminé comme s'il était potentiellement infectieux. Respecter la réglementation locale en matière de résidus.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS :

1. Ajouter 1000 µl d'eau pour biologie moléculaire à chaque ampoule **1** ou **2** puis mélanger jusqu'à obtenir une reconstitution totale. La concentration sera d'environ 35 000 copies/ml une fois reconstitué.
2. Agiter au vortex pendant 30 secondes pour dissoudre et homogénéiser complètement.
3. Suivre le mode d'emploi du kit de diagnostic en traitant le TOTAL CONTROL de la même manière qu'un échantillon clinique, et en utilisant la quantité recommandée pour l'extraction et la détection.

GeneXpert® MTB/RIF :

1. Ajouter 1 000 µl d'eau pour biologie moléculaire à chaque flacon **1** ou **2** et mélanger jusqu'à reconstitution complète. La concentration sera d'environ 35 000 copies/ml une fois reconstituée.
2. Ajouter 2 000 µl de tampon SR à la solution de contrôle en suspension.
3. Mélanger vigoureusement en inversant 10-20 fois.



4. Laisser incuber 5 minutes à température ambiante.
5. Mélanger de nouveau en inversant 10-20 fois.
6. Laisser de nouveau incuber 10 minutes à température ambiante.
7. Ajouter 2 000 µl de la solution de contrôle reconstituée à la cartouche GeneXpert® MTB/RIF.

CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE :

Chaque lot est soumis à un contrôle de qualité interne avant sa commercialisation. Le contrôle de qualité est effectué à l'aide d'un kit de préparation d'échantillons et d'un essai de PCR en temps réel pour la quantification. Les résultats finaux du contrôle de qualité de chaque lot sont disponibles.

INTERPRETATION DES RESULTATS ET PROTOCOLES DE VALIDATION POUR LES UTILISATEURS :

Voir les indications fournies dans les kits d'extraction et diagnostic supplémentaires.

LIMITES DU TEST :

1. Ce réactif est destiné à être utilisé avec des méthodes de diagnostic humain. Ce test n'a pas été vérifié avec d'autres méthodes.
2. Il est conseillé à l'utilisateur de ce kit de lire attentivement et de comprendre la notice. Le strict respect du protocole est nécessaire pour obtenir des résultats fiables.
3. L'utilisation de ce produit doit être réservée au personnel qualifié en biologie moléculaire.
4. L'utilisation de ce contrôle externe ne peut pas se substituer aux contrôles internes de la trousse.
5. Des conclusions sur la quantification ne peuvent pas être obtenues à partir d'un seul point de concentration connue. Une quantification précise de l'échantillon clinique requiert la méthode de la droite standard en utilisant un calibrateur comme MBC034 AmpliRun® MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.
6. AMPLIRUN® TOTAL n'a pas été conçu pour être utilisé avec le kit de diagnostic d'un fabricant en particulier. Il est utilisé pour valider et contrôler le traitement des échantillons, l'analyse et la détection d'une procédure opérationnelle en laboratoire de diagnostic.

PERFORMANCES :

• TEST D'IDENTITÉ

Une analyse PCR a été réalisée après extraction avec un couple d'amorces spécifiques à *M. tuberculosis*. La réaction produit un fragment de la taille espérée.

• TEST DE QUANTIFICATION

La quantification est réalisée par une qPCR en temps réel en utilisant une courbe d'étalonnage. Cette méthode implique l'utilisation de multiples répliquats de différentes dilutions sérielles tant du produit que du standard de quantification.

• PRÉCISION INTRA-ASSAY










3 ampoules de produit ont été extraites dans des conditions identiques et 3 répliquats de chaque extraction ont été amplifiés par le même opérateur dans les mêmes conditions de qPCR. Un coefficient de variation inférieur à 15% a été observé entre tous les essais.

• PRÉCISION INTER-ASSAY

1 ampoule de produit a été extraite et 3 répliquats de cette ampoule ont été amplifiés par 2 opérateurs différents pendant 3 jours consécutifs.

Un coefficient de variation inférieur à 15% a été observé entre tous les essais.

SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES :

	Usage <i>in vitro</i>
	Utiliser avant le : (date de péremption)
	Conserver à x-yc°C
	Numéro de lot
	Code produit
	Consulter la notice d'utilisation
	Reconstituer dans x µl
	Température de transport
	Température de conservation

BIBLIOGRAPHIE :

1. Bustin SA. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25(2) :169-193.
2. Bustin SA. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) : trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29(1) :23-39.
3. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. (1999). Quantitative RT-PCR : pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999 26(1) :112-122, 124-125.
4. Larionov A, Krause A, Miller W. (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* 6 :62.
5. Sanjuan-Jimenez R, Colmenero JD, Bermúdez P, Alonso A, Morata P. (2013). Amplicon DNA melting analysis for the simultaneous detection of *Brucella* spp and *Mycobacterium tuberculosis* complex. Potential use in rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis. *PLOS ONE* March 2013. Volume 8 Issue 3.

Pour toute information complémentaire contacter :

customerservice@vircell.com

RÉVISION: 2019-01-15

L-MBTC014-FR-01

