

AMPLIRUN® TOTAL MTB RIF RESISTANT CONTROL (SPUTUM)

Producto para diagnóstico *in vitro*

MBTC014: Células inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) resistentes a rifampicina formuladas para simular una muestra de esputo humano con el propósito de validar y controlar el procesamiento de muestra, análisis y detección de ensayos basados en la detección de ácidos nucleicos y la identificación de marcadores moleculares asociados a resistencia a rifampicina en MTB, utilizando el producto como un control externo.

INTRODUCCIÓN:

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria estrictamente aeróbica, no cromogénica, con crecimiento lento, ácido alcohol resistente y bacilar. El hombre es el único reservorio de *M. tuberculosis*, un patógeno obligado transmitido por partículas aéreas que puede permanecer latente durante años antes de causar una tuberculosis activa.

CARACTERÍSTICAS:

El contenido está liofilizado. Es necesario reconstituirlo antes de usarlo (Ver "Preparación de los reactivos"). Los Controles Totales están diseñados para un solo uso, el material no utilizado debe ser desechado. La detección de ácidos nucleicos requiere de un paso de extracción que permita la liberación del ADN/ARN para la amplificación y detección.

Descripción del producto:

MTB: Crecido en medio de cultivo Middlebrook 7H9. Una vez purificadas, las células fueron inactivadas y diluidas en una matriz de esputo humano.

CONTENIDO DEL KIT:

1 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (531) CONTROL (SPUTUM): 5 viales con células liofilizadas de *M. tuberculosis* (20000-50000 copias/vial) conteniendo una mutación en el gen *rpoB* (S531L) que confiere resistencia a rifampicina. La concentración del lote se indica en el Certificado de Análisis.

2 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (526) CONTROL (SPUTUM): 5 viales con células liofilizadas de *M. tuberculosis* (20000-50000 copias/vial) conteniendo una mutación en el gen *rpoB* (H526D) que confiere resistencia a rifampicina. La concentración del lote se indica en el Certificado de Análisis.

La cuantificación de *M. tuberculosis* fue realizada mediante recuento de unidades formadoras de colonias en placas de agar Middlebrook.

La validación de la cuantificación fue realizada mediante PCR en tiempo real.

Material necesario no contenido en el kit:

Agua de grado molecular.

Kit adicional de extracción y detección.

CONSERVACIÓN:

No requiere condiciones especiales de transporte. Conservar en estado liofilizado a 2-8°C. Tras reconstitución, la suspensión

debe ser utilizada en el mismo día. El producto no utilizado debe ser desechado.

ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:

Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas. Utilizar solo la cantidad de reactivo necesaria para la realización de la prueba.

El producto es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se sigan las instrucciones de uso.

VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.

RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:

1. Este producto es solo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
2. El uso de puntas de pipeta con filtro es esencial para evitar contaminaciones.
3. Las muestras deben ser tratadas como si fuesen infecciosas utilizando procedimientos de seguridad del laboratorio. Mantener limpias y desinfectadas todas las superficies de trabajo con una solución recién preparada de hipoclorito sódico 0,5% en agua desionizada o destilada.
4. Para la realización del test es esencial tener áreas de trabajo independientes.
5. Todo el material no usado debe ser desechado de acuerdo a la regulación aplicable.
6. El componente VIRCELL TOTAL CONTROL podrá contener material genético o sustancias de origen animal y/o humano. VIRCELL TOTAL CONTROL contiene microorganismos inactivados, no obstante, debería ser considerado potencialmente infeccioso y manipulado con cuidado. Ningún método actual puede asegurar por completo la ausencia de éstos u otros agentes infecciosos. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Observe la regulación local en materia de residuos.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

1. Añadir 1000 µl de agua de grado molecular a cada vial **1** o **2** y mezclar hasta una total reconstitución. La concentración será de aproximadamente 35000 copias/ml una vez reconstituido.
2. Agitar con vortex durante 30 segundos para disolver y homogeneizar completamente.
3. Seguir las instrucciones del kit de diagnóstico tratando el TOTAL CONTROL del mismo modo que una muestra clínica utilizando la cantidad recomendada para la extracción y detección.

GeneXpert® MTB/RIF:

1. Añadir 1000 µl de agua de grado molecular a cada vial **1** o **2** y mezclar hasta una total reconstitución. La concentración será de aproximadamente 35000 copias/ml una vez reconstituido.
2. Añadir 2000 µl del buffer SR al control resuspendido.
3. Mezclar por inversión 10-20 veces.
4. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Mezclar otra vez por inversión 10-20 veces.
6. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Añadir 2000 µl de la solución resultante con el control al cartucho GeneXpert® MTB/RIF

CONTROL DE CALIDAD INTERNO:

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación. El control de calidad se realiza utilizando un kit de preparación de muestras y un ensayo de PCR en tiempo real



para la cuantificación. Los resultados finales del control de calidad de cada lote están disponibles.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA USUARIOS:

Seguir indicaciones de kit adicional de extracción y detección.

LIMITACIONES DEL MÉTODO:

1. Este reactivo está diseñado para ser utilizado con métodos de diagnóstico humano. No ha sido verificado con otro tipo de método.
2. El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables.
3. Este producto está indicado para ser usado solo por personal formado en técnicas de biología molecular.
4. El uso de este control externo no sustituye al de los controles del kit de diagnóstico empleado.
5. Conclusiones sobre cuantificación no pueden ser obtenidas mediante un único punto de concentración conocida. Una cuantificación precisa de la muestra clínica requiere del método de la recta estándar utilizando un calibrador como MBC034 AmpliRun® MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DNA CONTROL.
6. AMPLIRUN® TOTAL no ha sido diseñado para ser utilizado con un kit de diagnóstico particular proveniente de un determinado fabricante. Se utiliza para validar y controlar el procesamiento de muestras, el análisis y la detección de un procedimiento funcional de laboratorio de diagnóstico.

PRESTACIONES:

• TEST DE IDENTIDAD

Un análisis de PCR fue realizado después de la extracción con una pareja de cebadores específicos para *M. tuberculosis*. La reacción produjo un fragmento del tamaño esperado.

• TEST DE CUANTIFICACIÓN

La cuantificación se realiza mediante qPCR a tiempo real empleando una curva de calibrado. Este método implica el uso de múltiples réplicas de diferentes diluciones seriadas tanto del producto como del estándar de cuantificación.







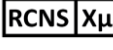


• PRECISIÓN INTRAENSAYO

3 viales del producto fueron extraídos bajo idénticas condiciones y 3 réplicas de cada extracción fueron amplificadas por el mismo operador bajo las mismas condiciones de qPCR. El coeficiente de variación fue menor del 15% entre todos los ensayos.

• PRECISIÓN INTERENSAYO

1 vial del producto fue extraído y 3 réplicas de este vial fueron amplificadas por 2 operadores diferentes en 3 días consecutivos. El coeficiente de variación fue menor del 15% entre todos los ensayos.

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:

	Producto para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
	Conservar entre x- $^{\circ}$ C
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	Reconstituir en x μ l
	Temperatura de transporte
	Temperatura de almacenamiento

BIBLIOGRAFÍA:

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.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:

customerservice@vircell.com

REVISADO: 2019-01-15

L-MBTC014-ES-01

