

AMPLIRUN® TOTAL GASTROINTESTINAL BACTERIAL PANEL CONTROL (STOOL)

Producto para diagnóstico *in vitro*

MBTC021: Un panel con la mezcla de 6 bacterias patógenas gastrointestinales inactivadas y formuladas en una matriz que imita una muestra real de heces. La Tabla 1 recoge la información referente al tipo de bacteria, cepa y medio de cultivo empleado para cada una de ellas. Dicho control se ha desarrollado con el propósito de validar y controlar el procesamiento de muestra, amplificación y detección de ácidos nucleicos en ensayos basados en la identificación molecular de bacterias gastrointestinales, utilizando el producto como un control externo.

INTRODUCCIÓN:

La gastroenteritis bacteriana es una enfermedad común y ampliamente distribuida en todo el mundo, causando millones de muertes cada año. Normalmente es el resultado de una intoxicación alimentaria y bajos niveles de saneamiento del agua. Los síntomas más comunes son vómitos, diarrea y malestar abdominal. La identificación del agente etiológico causante de la gastroenteritis bacteriana mediante los métodos diagnósticos convencionales, como el cultivo y la microscopía, resulta lenta y laboriosa. La gran ventaja que ofrecen los métodos moleculares es un método de detección más precoz.

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:

Las distintas bacterias se cultivaron en el laboratorio (ver en Tabla 1 el medio de cultivo empleado en cada caso), se inactivaron y se diluyeron en una matriz sintética de heces. Dicha matriz se ha formulado para imitar especímenes reales según la escala de heces de Bristol. Esta matriz se ajustó a un nivel de 7 en la escala de Bristol que es el equivalente a heces acuosas.

BACTERIA	CEPA	MEDIO DE CULTIVO
<i>Campylobacter jejuni</i>	Martin AS-83-79	Agar selectivo de <i>Campylobacter</i>
<i>Clostridium difficile</i>	Cepa tipo	Agar sangre
<i>Escherichia coli</i>	EHEC	Agar sangre
<i>Salmonella enteritidis</i>	CDC K-1891	Agar sangre
<i>Shigella flexneri</i>	Sv 2b Gp B	Agar sangre
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Billups-1803-68	Agar sangre

Tabla 1.

CONTENIDO DEL KIT:

1 VIRCELL TOTAL GASTROINTESTINAL BACTERIAL PANEL CONTROL (STOOL): 10 viales con una mezcla de bacterias gastrointestinales simulando una muestra clínica de heces. Cada una de las bacterias se encuentra en un rango de

concentración de 10000-25000 copias/vial. La concentración del lote se indica en el Certificado de Análisis.

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:

- Este producto es solo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
- El uso de puntas de pipeta con filtro es esencial para evitar contaminaciones.
- 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.
- Para la realización del test es esencial tener áreas de trabajo independientes.
- Todo el material no usado debe ser desechado de acuerdo a la regulación aplicable.
- 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:

- Añadir 500 µl de agua de grado molecular a cada vial **1** y mezclar hasta una total reconstitución. La concentración de cada bacteria será aproximadamente de 35000 copias/ml tras la reconstitución.
- Agitar con vortex durante 30 segundos para disolver y homogeneizar completamente.
- 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.



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.
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 cada una de las bacterias presentes en el panel. Las reacciones produjeron fragmentos de los tamaños esperados.

• TEST DE CUANTIFICACIÓN

El test de cuantificación se llevó a cabo por PCR a tiempo real utilizando el método de cuantificación absoluta mediante curva estándar. Este método emplea múltiples réplicas de diversas diluciones seriadas, tanto del producto como del estándar de cuantificación.







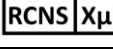


• PRECISIÓN INTRAENSAYO

3 viales del producto fueron extraídos bajo idénticas condiciones de extracción 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 ese 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-y°C
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	Reconstituir en x µl
	Temperatura de transporte
	Temperatura de almacenamiento

BIBLIOGRAFÍA:

1. Alonso R, Martín A, Peláez T, Marín M, Rodríguez-Creixéms M and Bouza E. (2005). Toxigenic status of *Clostridium difficile* in a large Spanish teaching hospital. *J Med Microbiol.* 54, 159–162.
2. Bustin SA. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25(2):169-193.
3. Bustin SA. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29(1):23-39.
4. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999 26(1):112-122, 124-125.
5. Hsu, B.-M., Wu, S.-F., Huang, S.-W., Tseng, Y.-J., Ji, D.-D., Chen, J.-S. and Shih, F.-C. (2010) Differentiation and identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental waters by a molecular method and biochemical test. *Water Res* 44, 949–955.
6. Larionov A, Krause A, Miller W. (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* 6:62.
7. Lee SH, Jung BY, Rayamahji N, Lee HS, Jeon WJ, Choi KS, Kweon CH, Yoo HS (2009). A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Enteritidis* in meats. *J Vet Sci.* 10(1):43-51.
8. Lewis SJ, Heaton KW. (1997). Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol.* 32(9):920-4.
9. O'Hanlon KA, Catarama TM, Duffy G, Blair IS, McDowell DA (2004). RAPID detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 96(5):1013-23.
10. Randall L. (2010) Development and evaluation of internal amplification controls for use in a real-time duplex PCR assay for detection of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J Med Microbiol* 59:172-8.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:
customerservice@vircell.com

REVISADO: 2019-06-07
L-MBTC021-ES-02

