

AMPLIRUN® TOTAL MDR-TB VERIFICATION & CONTROL PANEL (SPUTUM)

Für die *In-vitro*-Diagnostik

MBTC027: Inaktivierte *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), die so zusammengesetzt sind, dass sie menschliche Sputumproben nachahmen und dazu bestimmt sind, Probenverarbeitung, -analyse und -nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* (TB)-Nukleinsäure und genetischen Markern für Arzneimittelresistenzen zu kontrollieren, wobei das Produkt als externe Verlaufskontrolle verwendet wird. MBTC027 ist eine Gruppe mit 5 Bestandteilen; 1 sensitiver, 2 rifampicinresistente und 2 isoniazid-resistente Erregerstämme.

EINLEITUNG:

Mycobacterium tuberculosis ist ein strikt aerobes, nicht chromogenes, langsam wachsendes, säurefestes, bazillenförmiges Bakterium.

Der Mensch ist das einzige Reservoir des *M. tuberculosis*, eines obligaten Erregers, der durch Luftpartikel übertragen wird und jahrelang latent bleiben kann, bevor er eine aktive Tuberkulose auslöst.

MERKMALE:

Der Inhalt wird lyophilisiert. Vor Gebrauch muss die Nukleinsäure rekonstituiert werden (siehe „Vorbereitung der Reagenzien“). Gesamtkontrollen sind für den einmaligen Gebrauch ausgelegt, überschüssiges Material sollte entsorgt werden. Der Nachweis von Nukleinsäure erfordert einen Extraktionsschritt, der DNA/RNA zur Amplifikation und zum Nachweis freisetzt.

Produktbeschreibung:

MTB: Anzucht in Middlebrook 7H9-Bouillon Nach der Reinigung werden die Zellen inaktiviert, so dass sie nicht infektiös sind und in einer menschlichen Sputummatrix verdünnt.

BESTANDTEILE DES KITS:

1 VIRCELL TOTAL MTB CONTROL (SPUTUM): 2 Fläschchen mit lyophilisierten Zellen vom sensitiven Erregerstamm des *M. tuberculosis* (20000-50000 Kopien/Fläschchen). Die Chargenkonzentration ist im Analysezertifikat angegeben.

2 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (531) CONTROL (SPUTUM): 2 Fläschchen mit lyophilisierten Zellen von *M. tuberculosis* (20000-50000 Kopien/Fläschchen) mit einer *rpoB*-Mutation (S531L), die Rifampicinresistenz verleiht. Die Chargenkonzentration ist im Analysezertifikat angegeben.

3 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (526) CONTROL (SPUTUM): 2 Fläschchen mit lyophilisierten Zellen von *M. tuberculosis* (20000-50000 Kopien/Fläschchen) mit einer *rpoB*-Mutation (H526D), die Rifampicinresistenz verleiht. Die Chargenkonzentration ist im Analysezertifikat angegeben.

4 VIRCELL TOTAL MTB INH RESISTANT (katG) CONTROL (SPUTUM): 2 Fläschchen mit lyophilisierten Zellen von *M. tuberculosis* (20000-50000 Kopien/Fläschchen) mit einer *katG*-Mutation (S315T), die Isoniazidresistenz verleiht. Die Chargenkonzentration ist im Analysezertifikat angegeben.

5 VIRCELL TOTAL MTB INH RESISTANT (inhA) CONTROL (SPUTUM): 2 Fläschchen mit lyophilisierten Zellen von *M. tuberculosis* (20000-50000 Kopien/Fläschchen) mit einer *inhA*-Mutation (C15T), die Isoniazidresistenz verleiht. Die Chargenkonzentration ist im Analysezertifikat angegeben.

Die Quantifizierung der *M. tuberculosis* erfolgte durch eine koloniebildende Einheit, die auf Middlebrook-Agarplatten gezählt wurde.

Die Validierung der Quantifizierung erfolgte durch ein Real Time-PCR-Instrument.

Zusätzlich benötigte Materialien, die nicht im Kit enthalten sind:

Wasser in Molekularbiologiequalität.

Zusätzliches Extraktions- und Diagnosekit.

BD MAX™-Instrument (optional)

LAGERBEDINGUNGEN:

Keine besonderen Transportbedingungen erforderlich. Lagern Sie das lyophilisierte Fläschchen bei 2-8°C. Nach der Rekonstitution sollte die Suspension noch am selben Tag angewendet werden. Das nicht verwendete Produkt sollte entsorgt werden.

STABILITÄT UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN:

Die Handhabung aller Reagenzien sollte unter aseptischen Bedingungen erfolgen, um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden. Nur die für den Test tatsächlich benötigte Menge an Reagenzien einsetzen.

Das Produkt ist bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, wenn die Gebrauchsanleitung beachtet wird.

VIRCELL, S.L. ist nicht verantwortlich für Fehler, die durch eine falsche Handhabung der Reagenzien dieses Kits verursacht wurden.

EMPFEHLUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN:

1. Einsatz ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnose und nur für den professionellen Einsatz geeignet.
2. Zur Vermeidung von Kontaminationen sind sterile Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere erforderlich.
3. Die Proben sollten als infektiöse Proben unter Einsatz von Sicherheitslaborverfahren behandelt werden. Alle Arbeitsflächen sind mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 0,5 % igem Natriumhypochlorit und deionisiertem bzw. destilliertem Wasser gründlich zu reinigen und zu desinfizieren.
4. Für die Durchführung des Tests sind unbedingt getrennte Arbeitsbereiche erforderlich.
5. Die Entsorgung ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend den geltenden Vorschriften erfolgen.
6. Die Bestandteile des VIRCELL TOTAL CONTROL Kit können möglicherweise genetisches Material oder genetische Substanzen tierischen und/oder humanen Ursprungs enthalten. VIRCELL TOTAL CONTROL enthält inaktivierte Mikroorganismen. Dennoch sollte das Produkt als potenziell infektiös angesehen und mit der nötigen Vorsicht behandelt werden. Die Inaktivierung wurde durch das Fehlen von Wachstum unter den gleichen Anzuchtbedingungen verifiziert, die für jeden Mikroorganismus gelten. Gegenwärtig kann keine Methode eine vollständige Abwesenheit dieser oder anderer infektiöser Bestandteile versichern. Alle Materialien sollten wie potenziell infektiöse Stoffe behandelt und entsorgt werden. Beachten Sie die örtlichen Bestimmungen für die Entsorgung von Abfällen.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:

1. Geben Sie 1000 µl Wasser in Molekularbiologiequalität in das Fläschchen mit der Nummer **1**, **2**, **3**, **4** oder **5** und mischen Sie es, bis es vollständig rekonstituiert ist. Die Zellkonzentration wird nach der Rekonstitution etwa 35000 Kopien/ml betragen.
2. 30 Sekunden lang bis zur vollständigen Auflösung und Homogenisierung vortexen.
3. Befolgen Sie die Anweisungen des Diagnostik-Kits, um die VIRCELL TOTAL CONTROL auf die gleiche Weise wie eine klinische Probe zu behandeln, wobei die empfohlene Menge für die Extraktion und den Nachweis verwendet wird.

Empfohlenes Protokoll für den BD MAX MDR-TB Assay (optional)

Folgende Vorgehensweise zum Testen von AmpliRun® TOTAL MDR-TB Verification & Control Panel im BD MAX-Gerät ist erforderlich:

1. Beschriften Sie ein Probenröhrchen mit der entsprechenden Kennzeichnung.
2. Mit dem BSL2-Verfahren wird die Vircell-Kontrollprobe mit 1 ml nukleasearmem Wasser rehydriert.
3. Öffnen Sie das BD MAX STR Röhrchen vorsichtig und geben Sie 2 ml STR zur rehydrierten Kontrollprobe hinzu. Das endgültige Verhältnis von STR zur Probe beträgt 2:1.
4. Verschließen Sie das Fläschchen und schütteln (nicht vortexen) Sie die Lösung 10 mal kräftig (auf und ab entspricht 1 mal).
5. Bei Raumtemperatur 5 Minuten lang inkubieren und erneut 10 mal kräftig schütteln.
6. Inkubieren Sie die mit BD MAX STR behandelte Kontrollprobe bei Raumtemperatur 25 Minuten lang.
7. Überführen Sie mit der Transferpipette 2,5 mL der STR-behandelten Kontrollprobe in ein beschriftetes Probenröhrchen. Überprüfen Sie



nochmals, ob die Probenkennung auf dem Probenröhrchen mit dem Etikett auf dem Kontrollprobenfläschchen übereinstimmt.

8. Schließen Sie das Probenröhrchen mit einer blauen Septumkappe.

9. Bereiten Sie alle zusätzlichen Kontrollproben für den Test vor, indem Sie die Schritte 1 bis 10 wiederholen.

10. Fahren Sie mit dem Abschnitt BD MAX Systembetrieb fort, um den Test des BD MAX MDR-TB auf dem BD MAX-System durchzuführen.

ERWARTETE ERGEBNISSE für BD MAX™ MDR-TB-Assay:

Gruppenbestandteil	MTB Test-Erregerstamm	BD MAX™ MDR-TB Assay Erwartetes Ergebnis
1	<i>M. tuberculosis</i> sensibler Erregerstamm	MTB nachgewiesen RIF/INH Resistenz NICHT nachgewiesen
2	<i>M. tuberculosis</i> Rifampicinresistenter Erregerstamm (Mutation in <i>rpoB</i> 531-Rest)	MTB nachgewiesen RIF-Resistent Nachgewiesen INH-Resistenz NICHT nachgewiesen
3	<i>M. tuberculosis</i> Rifampicinresistenter Erregerstamm (Mutation in <i>rpoB</i> 526-Rest)	MTB nachgewiesen RIF-Resistent Nachgewiesen INH-Resistenz NICHT nachgewiesen
4	<i>M. tuberculosis</i> isoniazidresistenter Erregerstamm (Mutation in <i>katG</i>)	MTB nachgewiesen RIF-Resistenz NICHT nachgewiesen INH-Resistenz nachgewiesen
5	<i>M. tuberculosis</i> isoniazidresistenter Erregerstamm (Mutation im <i>nhA</i> -Promotor)	MTB nachgewiesen RIF-Resistenz NICHT nachgewiesen INH-Resistenz nachgewiesen

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE:

Jede Charge wird internen Qualitätskontrollen unterzogen, bevor sie freigegeben wird. Die Qualitätskontrollanalyse wird mit einem Probenvorbereitung Kit und Real Time-PCR für die Quantifizierung durchgeführt. Für jede einzelne Charge sind abschließende Ergebnisse der Qualitätskontrolle verfügbar.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE UND TESTVALIDIERUNG FÜR ANWENDER:

Siehe Angaben des zusätzlichen Extraktions- und Diagnosekits.

EINSCHRÄNKUNGEN:

1. Dieses Reagens ist zur Anwendung bei Verfahren zur Humandiagnostik bestimmt. Dieser Test wurde nicht mit anderen Verfahren verifiziert.
2. Dem Anwender des Tests wird empfohlen, diese Gebrauchsanleitung sorgfältig zu lesen und die einzelnen Schritte nachzuvollziehen. Die strikte Einhaltung der Gebrauchsanleitung ist notwendig, um verlässliche Ergebnisse zu erlangen.
3. Nur Personen, die über Erfahrung mit molekularen Verfahren verfügen, sollten dieses Produkt anwenden.
4. Diese externe Verlaufskontrolle ersetzt nicht die internen Diagnosekit-Kontrollen.
5. Quantifizierungsergebnisse können nicht aus einer einzigen Punktprobe bekannter Konzentration gezogen werden. Eine genaue Quantifizierung der klinischen Proben konnte nur mit der Standardkurvenmethode mit einem Kalibrator wie MBC034 AmpliRun® MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DNA CONTROL erreicht werden.
6. AMPLIRUN® TOTAL wurde nicht entwickelt, um mit einem speziellen Diagnose-Kit eines bestimmten Herstellers verwendet zu werden. Es dient zur Validierung und Kontrolle der Probenverarbeitung, Analyse und Detektion eines diagnostischen Laborbetriebsverfahrens.

LEISTUNGEN:

• IDENTITÄTSTEST

Die PCR-Analyse wurde nach der Extraktion mit einem spezifischen Oligonukleotidpaar für *M. tuberculosis* durchgeführt. Die Reaktion ergab ein Fragment in der zu erwartenden Größe.

• QUANTIFIZIERUNGSTEST

Die Quantifizierung beruht auf der Echtzeit-qPCR mithilfe von Standardkurven. Dieses Verfahren beinhaltet die Anwendung mehrerer Wiederholungen verschiedener serieller Verdünnungen sowohl des Produkts als auch des Quantifizierungsstandards.

• INTRA-ASSAY-PRÄZISION

3 Probengefäße des Produkts wurden unter identischen Extraktionsbedingungen extrahiert und 3 Replikate jeder Extraktion wurden von demselben Bediener unter identischen qPCR-Bedingungen amplifiziert. Bei allen Assays wurde ein Variationskoeffizient von weniger als 15% festgestellt.

• INTER-ASSAY-PRÄZISION

Ein Fläschchen des Produkts wurde entnommen und 3 Replikate dieses Fläschchens wurden von 2 verschiedenen Anwendern an 3 aufeinander folgenden Tagen amplifiziert. Bei allen Assays wurde ein Variationskoeffizient von weniger als 15% festgestellt.

BD MAX™ MDR-TB VALIDIERUNG

Drei einmalige Chargen von VIRCELL TOTAL MTB CONTROL wurden von zwei BD MAX-Operationen getestet, die zwei BD MAX-Plattformen zugeordnet sind, wobei zwei verschiedene BD MAX MDR-TB Assay-Reagenzien über beide BD MAX-Plattformen hinweg getestet wurden. Alle drei Chargen von VIRCELL TOTAL MTB CONTROL wurden bei jedem BD MAX Lauf getestet. Es ergaben sich 12 valide Ergebnisse pro Stamm über drei Chargen von Kontrollen hinweg.

Die Positive Prozentuale Übereinstimmung (PPA) wurde wie folgt ermittelt;

$100 \times \frac{TP}{TP + FN}$, wobei TP = True Positive = Echtes Positiv definiert durch die Identifikation der VIRCELL TOTAL MTB CONTROL und FN = False Negative = Falschnegativ definiert als BD MAX Ergebnis, das nicht mit der Identifikation der VIRCELL TOTAL MTB CONTROL übereinstimmt.

Gruppenbestandteil	BD MAX™ Charge 1 (x 2 Anwender)			BD MAX™ Charge 2 (x 2 Anwender)			Gesamt N	PPA*
	1	2	3	1	2	3		
1	2	2	2	2	2	2	12	12/12=100%
2	2	2	2	2	2	2	12	12/12=100%
3	2	2	2	2	2	2	12	12/12=100%
4	2	2	2	2	2	2	12	12/12=100%
5	2	2	2	2	2	2	12	12/12=100%

*PPA: Positive Prozentuale Übereinstimmung

BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOL:

	In-vitro-Diagnostikum: Medizinprodukt
	Verwendbar bis (Verfallsdatum)
	Bei x-y °C lagern
	Chargennummer
	Bestellnummer
	Gebrauchsanleitung beachten
	In x µl rekonstituieren
	Versandtemperatur
	Lagertemperatur



LITERATUR:

1. Devonshire AS, O'Sullivan DM, Honeyborne I, Jones G, *et al.* (2016). The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2016 Aug 3;16:366.
2. Zimmermann S, Dalpke AH, Murray P, Cooper C (2018). Pre-validation of the BD MAX MDR-TB assay for the rapid detection of MTBc DNA and mutations associated with rifampin and isoniazid resistance. Poster presented at 29th ECCMID (Madrid).
3. Scott L, Albert H, Gilpin C, Alexander H, DeGruy K, Stevens W. (2014). Multicenter feasibility study to assess external quality assessment panels for Xpert MTB/RIF assay in South Africa. *J Clin Microbiol.* 2014 Jul;52(7):2493-9.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an:

customerservice@vircell.com

DURCHGESEHEN: 2019-05-09
L-MBTC027-DE-02

