

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

Producto para diagnóstico *in vitro*

**MBTC027:** Células inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) formuladas para simular muestras de esputo humano con el propósito de controlar el procesamiento, análisis y detección de muestras de ácidos nucleicos de *Mycobacterium tuberculosis* (TB) y marcadores moleculares asociados a la resistencia a fármacos, utilizando el producto como un control externo. El panel MBTC027 está compuesto por 5 miembros: 1 cepa sensible, 2 cepas resistentes a rifampicina y 2 cepas resistentes a isoniazida.

### 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 CONTROL (SPUTUM): 2 viales con células liofilizadas de *M. tuberculosis*, cepa sensible (20000-50000 copias/vial). La concentración del lote se indica en el Certificado de Análisis.

2 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (531) CONTROL (SPUTUM): 2 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.

3 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (526) CONTROL (SPUTUM): 2 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.

4 VIRCELL TOTAL MTB INH RESISTANT (katG) CONTROL (SPUTUM): 2 viales con células liofilizadas de *M. tuberculosis* (20000-50000 copias/vial) conteniendo una mutación en el gen *katG* (S315T) que confiere resistencia a isoniazida. La concentración del lote se indica en el Certificado de Análisis.

5 VIRCELL TOTAL MTB INH RESISTANT (inhA) CONTROL (SPUTUM): 2 viales con células liofilizadas de *M. tuberculosis* (20000-50000 copias/vial) conteniendo una mutación en el gen *inhA* (C15T) que confiere resistencia a isoniazida. 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.

Plataforma BD MAX™ (opcional)

### 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 1000 µl de agua de grado molecular al vial 1, 2, 3, 4 o 5 y mezclar hasta una total reconstitución. La concentración será de aproximadamente 35000 copias/ml una vez reconstituido.
- Agitar con vortex durante 30 segundos para disolver y homogeneizar completamente.
- Seguir las instrucciones del kit de diagnóstico tratando el VIRCELL TOTAL CONTROL del mismo modo que una muestra clínica utilizando la cantidad recomendada para la extracción y detección.

### Protocolo recomendado para el ensayo con BD MAX™ MDR-TB assay (opcional):

El procedimiento para testar AmpliRun® TOTAL MDR-TB Verification & Control Panel en el instrumento BD MAX™ es el siguiente:

- Identificar cada "Sample Tube" de manera apropiada.
- Utilizando el procedimiento de BSL-2, rehidratar el control Vircell con 1 ml de agua libre de nucleasas.
- Abrir con cuidado el tubo STR de BD MAX™ y añadir 2 ml de STR al control rehidratado. La ratio final de STR y muestra es 2:1.
- Cerrar el vial y agitar vigorosamente la solución (no utilizar vortex) diez veces (arriba y abajo es igual a 1 vez).
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y agitar vigorosamente de nuevo 10 veces.
- Incubar de BD MAX™ STR y el control tratado a temperatura ambiente durante 25 minutos.
- Usando la pipeta de transferencia, transferir 2,5 ml del control tratado-STR a un "Sample Tube" etiquetado. Verificar nuevamente que la identificación de la muestra y el "Sample Tube" coincida con la etiqueta del vial de control.



8. Cerrar "Sample Tube" con un tapón azul.
9. Preparar cualquier control adicional para la prueba repitiendo los pasos del 1 al 10.
10. Continuar con la sección de Operación del sistema de BD MAX™ para realizar la prueba de BD MAX™ MDR-TB en la plataforma BD MAX™.

#### RESULTADOS ESPERADO EN EL ENSAYO DE BD MAX™ MDR-TB:

Referencia del Panel	Cepa de control MTB	Resultado esperado del Ensayo BD MAX™ MDR-TB
1	Cepa sensible <i>M. tuberculosis</i>	MTB detected RIF/INH Resistance NOT detected
2	<i>M. tuberculosis</i> cepa resistente a rifampicina (mutación en la posición <i>rpoB</i> 531)	MTB detected RIF Resistance Detected INH Resistance NOT Detected
3	<i>M. tuberculosis</i> cepa resistente a la rifampicina (mutación en la posición <i>rpoB</i> 526)	MTB detected RIF Resistance Detected INH Resistance NOT Detected
4	<i>M. tuberculosis</i> cepa resistente a la isoniazida (mutación en <i>katG</i> )	MTB detected RIF Resistance NOT Detected INH Resistance Detected
5	<i>M. tuberculosis</i> cepa resistente a la isoniazida (mutación en el promotor <i>inhA</i> )	MTB detected RIF Resistance NOT Detected INH Resistance Detected

#### 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.

#### VALIDACIÓN BD MAX™ MDR-TB

Se ensayaron tres lotes de VIRCELL TOTAL MTB CONTROL por dos operadores asignados a dos plataformas diferentes BD MAX™, testando dos lotes diferentes del kit BD MAX™ MDR-TB en ambas plataformas BD MAX™. Los tres lotes de VIRCELL TOTAL MTB CONTROL se analizaron en cada ensayo BD MAX™.

Se obtuvieron 12 resultados válidos por cepa en tres lotes de controles.

El porcentaje de acuerdo positivo (PPA) se determinó de la siguiente manera:

$100 \times TP / TP + FN$  donde TP = Verdadero Positivo definido por la identificación de VIRCELL TOTAL MTB CONTROL y FN = Falso Negativo definido como resultado BD MAX™ que no coincide con la identificación VIRCELL TOTAL MTB CONTROL.

Referencia del Panel	Lote 1 BD MAX™ (x 2 operarios)			Lote 2 BD MAX™ (x 2 operarios)			Nº Total	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: Porcentaje de Acuerdo Positivo

#### 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. Devonshire AS, O'Sullivan DM, [Honeyborne J](#), 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. 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.
3. 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).

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:

[customerservice@vircell.com](mailto:customerservice@vircell.com)

**REVISADO: 2019-01-15**  
**L-MBTC027-ES-02**

