

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

Usage *in vitro* uniquement

MBTC027: Cellules inactivées de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) formulées pour simuler des spécimens d'expectorations humaines et destinées à contrôler le traitement des échantillons, l'analyse et la détection des acides nucléiques de *Mycobacterium tuberculosis* (TB) et des marqueurs génétiques de la résistance aux médicaments en utilisant le produit comme contrôle externe de l'exécution. Le panel MBTC027 est composé de 5 membres : 1 souche sensible, 2 souches résistantes à la rifampicine et 2 souches résistantes à l'isoniazide.

INTRODUCTION :

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie bacille strictement aérobic acido-alcool-résistante, non chromogène, à croissance lente. L'homme est le seul réservoir de *M. tuberculosis*, un pathogène obligatoire qui se transmet à travers 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: Cultivé dans le bouillon de culture Middlebrook 7H9. Une fois purifiées, les cellules sont inactivées, ce qui les rend non infectieuses, et diluées dans une matrice d'expectoration humaine.

COMPOSITION DU COFFRET :

1 VIRCELL TOTAL MTB CONTROL (SPUTUM) : 2 ampoules contenant des cellules lyophilisées de la souche sensible de *M. tuberculosis* (20000 - 50000 copies / ampoule). La concentration du lot est indiquée dans le Certificat d'analyse.

2 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (531) CONTROL (SPUTUM) : 2 ampoules contenant des cellules lyophilisées de *M. tuberculosis* (20000 - 50000 copies / ampoule) présentant une mutation *rpoB* (S531L) qui confère une résistance à la rifampicine. La concentration du lot est indiquée dans le Certificat d'analyse.

3 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (526) CONTROL (SPUTUM) : 2 ampoules contenant des cellules lyophilisées de *M. tuberculosis* (20000 - 50000 copies / ampoule) présentant une mutation *rpoB* (H526D) qui confère une résistance à la rifampicine. La concentration du lot est indiquée dans le Certificat d'analyse.

4 VIRCELL TOTAL MTB INH RESISTANT (katG) CONTROL (SPUTUM) : 2 ampoules contenant des cellules lyophilisées de *M. tuberculosis* (20000 - 50000 copies / ampoule) présentant une mutation *katG* (S315T) qui confère une résistance à l'isoniazide. La concentration du lot est indiquée dans le Certificat d'analyse.

5 VIRCELL TOTAL MTB INH RESISTANT (inhA) CONTROL (SPUTUM) : 2 ampoules contenant des cellules lyophilisées de *M. tuberculosis* (20000 - 50000 copies / ampoule) présentant une mutation *inhA* (C15T) qui confère une résistance à l'isoniazide. La concentration du lot est indiquée dans le Certificat d'analyse.

La quantification de *M. tuberculosis* a été effectuée par comptage des unités formant colonies sur des boîtes de gélose Middlebrook.

La validation de la quantification a été effectuée à l'aide d'un instrument de PCR en temps réel.

Matériel nécessaire non fourni :

Eau pour biologie moléculaire
Kit de extraction et diagnostic complémentaire
Instrument BD MAX™ (facultatif)

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. 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 dans l'ampoule 1, 2, 3, 4 ou 5 et mélanger jusqu'à reconstitution complète. La concentration sera d'environ 35000 copies / ml après reconstitution.
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 VIRCELL TOTAL CONTROL de la même manière qu'un échantillon clinique, et en utilisant la quantité recommandée pour l'extraction et la détection.

Protocole recommandé pour le test BD MAX™ MDR-TB (facultatif)

La procédure pour tester le AmpliRun® TOTAL MDR-TB Verification & Control Panel dans l'instrument BD MAX™ est la suivante :

1. Étiqueter un tube d'échantillon avec l'identification appropriée.
2. En suivant la procédure BSL2, réhydrater le contrôle Vircell avec 1 ml d'eau exempte de nucléase.
3. Ouvrir avec précaution le tube BD MAX™ STR et ajouter 2 ml de STR au contrôle réhydraté. Le rapport final entre les STR et l'échantillon est de 2:1.
4. Fermer l'ampoule et agiter (ne pas vortexer) la solution vigoureusement 10 fois (de haut en bas correspond à 1 fois).
5. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes et agiter à nouveau vigoureusement 10 fois.
6. Incuber le contrôle traité par BD MAX™ STR à température ambiante pendant 25 minutes.
7. À l'aide de la pipette de transfert, transférer 2,5 ml du contrôle traité par STR dans un Tube d'échantillon étiqueté. Vérifier que



l'identifiant de l'échantillon sur le Tube d'échantillon correspond à l'étiquette sur l'ampoule de contrôle.

8. Fermer le Tube d'échantillon avec un bouchon septum bleu.

9. Préparer les contrôles supplémentaires à tester en répétant les étapes de 1 à 10.

10. Aller à la rubrique Fonctionnement du système BD MAX™ pour effectuer le test du BD MAX™ MDR-TB sur le système BD MAX™.

RÉSULTATS ATTENDUS du test BD MAX™ MDR-TB :

Membre du panel	Souche de contrôle MTB	Test BD MAX™ MDR-TB Résultat attendu
1	Souche sensible de <i>M. tuberculosis</i>	MTB détecté Résistance RIF/INH NON détectée
2	Souche de <i>M. tuberculosis</i> résistante à la rifampicine (mutation dans le résidu <i>rpoB</i> 531)	MTB détecté Résistance RIF détectée Résistance INH NON détectée
3	Souche de <i>M. tuberculosis</i> résistante à la rifampicine (mutation dans le résidu <i>rpoB</i> 526)	MTB détecté Résistance RIF détectée Résistance INH NON détectée
4	Souche de <i>M. tuberculosis</i> résistante à l'isoniazide (mutation en <i>katG</i>)	MTB détecté Résistance RIF NON détectée Résistance INH détectée
5	Souche de <i>M. tuberculosis</i> résistante à l'isoniazide (mutation du promoteur <i>inhA</i>)	MTB détecté Résistance RIF NON détectée Résistance INH détectée

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.

INTERPRÉTATION 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 DNA CONTROL.
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

L'analyse PCR a été réalisée après extraction avec une paire d'oligonucléotides spécifiques de *M. tuberculosis*. La réaction a produit un fragment de la taille attendue.

• TEST DE QUANTIFICATION

La quantification est basée sur la qPCR en temps réel en utilisant la méthode de la droite standard. Cette méthode implique l'utilisation de multiples répétitions de différentes dilutions en série du produit et du calibrateur.

• PRÉCISION INTRA-ESSAI

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

• PRÉCISION INTER-ESSAI

1 ampoule du produit a été extraite et 3 répétitions de cette ampoule ont été amplifiées par 2 différents opérateurs pendant 3 jours consécutifs. Un coefficient de variation inférieur à 15 % a été observé entre tous les essais.

VALIDATION DU BD MAX™ MDR-TB

Trois lots uniques de VIRCELL TOTAL MTB CONTROL ont été testés par deux opérateurs BD MAX™ affectés à deux plateformes BD MAX™, en testant deux différents réactifs de test BD MAX™ MDR-TB sur les deux plateformes BD MAX™. Les trois lots de VIRCELL TOTAL MTB CONTROL ont été testés sur chaque plateforme BD MAX™. Au total, 12 résultats valides par souche ont été obtenus sur l'ensemble des trois lots de contrôles.

Le pourcentage de concordance positive (PPA) a été déterminé comme suit :

$100 \times \text{TP} / \text{TP} + \text{FN}$ où TP = Vrais positifs définis par l'identification du VIRCELL TOTAL MTB CONTROL et FN = Faux négatifs définis par un résultat BD MAX™ ne correspondant pas à l'identification du VIRCELL TOTAL MTB CONTROL.

Membre du panel	BD MAX™ Lot 1 (x 2 utilisateurs)			BD MAX™ Lot 2 (x 2 utilisateurs)			Total 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 : Pourcentage de concordance positive

SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES :

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



BIBLIOGRAPHIE :

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. 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).

Pour toute information complémentaire contacter :

customerservice@vircell.com

RÉVISION: 2019-01-15
L-MBTC027-FR-02

