

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

Solo per uso diagnostico in vitro

MBTC027: Cellule inattivate di *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) formulate per imitare i campioni di espettorato umano e destinate a controllare il trattamento, l'analisi e il rilevamento dei campioni nei test degli acidi nucleici di *Mycobacterium tuberculosis* (TB) e dei marcatori genetici di resistenza ai farmaci utilizzando il prodotto come controllo esterno dell'esecuzione. Il pannello MBTC027 è un pannello a 5 membri; 1 ceppo sensibile, 2 ceppi resistenti alla rifampicina e 2 ceppi resistenti all'isoniazide.

INTRODUZIONE:

Il *Mycobacterium tuberculosis* è un batterio bacillare acido veloce, strettamente aerobico, non cromogenico, a crescita lenta. Gli esseri umani sono l'unico serbatoio di *M. tuberculosis*, un agente patogeno obbligato che viene trasmesso da particelle trasportate dall'aria e può rimanere latente per anni prima di causare una tubercolosi attiva.

CARATTERISTICHE:

Il contenuto è liofilizzato. È necessario ricostituirlo prima dell'uso (vedere "Preparazione dei reagenti"). I controlli totali sono progettati per uso singolo, il materiale in eccesso deve essere eliminato. La rilevazione dell'acido nucleico richiede una fase di estrazione che rilascia DNA/RNA per l'amplificazione e la rilevazione.

Descrizione del prodotto:

MTB: Coltivato in brodo di coltura Middlebrook 7H9. Una volta purificate, le cellule vengono inattivate e diluite in una matrice di espettorato umano.

COMPOSIZIONE DEL KIT:

1 VIRCELL TOTAL MTB CONTROL (SPUTUM): 2 fiale con cellule liofilizzate di *M. tuberculosis*, ceppo sensibile (20000-50000 copie/fiala). La concentrazione del lotto è indicata nel Certificato di Analisi.

2 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (531) CONTROL (SPUTUM): 2 fiale con cellule liofilizzate di *M. tuberculosis*, (20000-50000 copie/fiala) con una mutazione *rpoB* (S531L) che conferisce resistenza alla rifampicina. La concentrazione del lotto è indicata nel Certificato di Analisi.

3 VIRCELL TOTAL MTB RIF RESISTANT (526) CONTROL (SPUTUM): 2 fiale con cellule liofilizzate di *M. tuberculosis*, (20000-50000 copie/fiala) con una mutazione *rpoB* (H526D) che conferisce resistenza alla rifampicina. La concentrazione del lotto è indicata nel Certificato di Analisi.

4 VIRCELL TOTAL MTB INH RESISTANT (katG) CONTROL (SPUTUM): 2 fiale con cellule liofilizzate di *M. tuberculosis*, (20000-50000 copie/fiala) con una mutazione *katG* (S315T) che conferisce resistenza all'isoniazide. La concentrazione del lotto è indicata nel Certificato di Analisi.

5 VIRCELL TOTAL MTB INH RESISTANT (inhA) CONTROL (SPUTUM): 2 fiale con cellule liofilizzate di *M. tuberculosis*, (20000-50000 copie/fiala) con una mutazione *inhA* (C15T) che conferisce resistenza all'isoniazide. La concentrazione del lotto è indicata nel Certificato di Analisi.

La quantificazione dell'*M. tuberculosis* è stata eseguita attraverso un'unità formante colonie eseguendo la conta su piastre di Agar Middlebrook.

La validazione della quantificazione è stata effettuata utilizzando uno strumento di PCR in tempo reale.

Materiale richiesto ma non fornito:

Acqua per biologia molecolare

Kit aggiuntivo per l'estrazione e la rilevazione
Strumento BD MAX™ (opzionale)

CONSERVAZIONE:

Non sono richieste condizioni di trasporto speciali. Conservare la fiala liofilizzata a 2-8°C. Dopo la ricostituzione, la sospensione deve essere utilizzata il giorno stesso. Il prodotto inutilizzato deve essere eliminato.

STABILITÀ E UTILIZZO DEI REAGENTI:

Maneggiare i reagenti in condizioni asettiche per evitare contaminazioni microbiologiche. Utilizzare solo la quantità di reagente necessaria per il test.

Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, se si seguono le istruzioni per l'uso.

VIRCELL, S.L. non risponde del cattivo utilizzo dei reagenti inclusi nel kit.

RACCOMANDAZIONI E PRECAUZIONI:

- Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico in vitro e da parte di personale qualificato e professionale.
- I puntali sterili con filtro per aerosol sono essenziali per prevenire la contaminazione.
- I campioni devono essere manipolati come se fossero infettivi utilizzando procedure di laboratorio per la sicurezza. Pulire e disinfettare accuratamente tutti i piani di lavoro con una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% in acqua deionizzata o distillata preparata al momento.
- Per eseguire il test è essenziale disporre di aree di lavoro separate.
- Smaltire i reagenti e i rifiuti non utilizzati in conformità alle normative vigenti.
- Il componente VIRCELL TOTAL CONTROL può comprendere materiale genetico o sostanze di origine animale e/o umana. VIRCELL TOTAL CONTROL contiene microrganismi inattivati, tuttavia, deve essere considerato potenzialmente infettivo e maneggiato con cura. L'inattivazione è stata verificata dall'assenza di crescita nelle stesse condizioni di coltura utilizzate per ciascun microrganismo. Nessun metodo attuale può dare la completa sicurezza che questi o altri agenti infettivi siano assenti. Tutti i materiali devono essere maneggiati ed eliminati come potenzialmente infetti. Osservare la regolamentazione locale per l'eliminazione dei rifiuti.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI:

- Aggiungere 1000 µl di acqua per biologia molecolare ad ogni fiala **1**, **2**, **3**, **4** o **5** e mescolare fino alla completa ricostituzione. Dopo la ricostituzione, la concentrazione sarà di circa 35000 copie/ml.
- Agitare con il vortex per 30 secondi per sciogliere e omogeneizzare completamente.
- Seguire le istruzioni del kit diagnostico trattando TOTAL CONTROL allo stesso modo di un campione clinico, utilizzando la quantità raccomandata per l'estrazione e la rilevazione.

Protocollo raccomandato per il saggio BD MAX™ MDR-TB (opzionale)

La procedura per testare il Pannello di controllo e verifica AmpliRun® TOTAL MDR-TB nello strumento BD MAX™ è la seguente:

- Etichettare una provetta per campione con l'identificazione appropriata.
- Utilizzando la procedura BSL-2, reidratare il controllo Vircell con 1 ml di acqua priva di nucleasi.
- Aprire con attenzione la provetta BD MAX™ STR e aggiungere 2 ml di STR al controllo reidratato. Il rapporto finale tra STR e campione è 2:1.
- Tappare il flaconcino e agitare vigorosamente (non su vortex) la soluzione per 10 volte (verso l'alto e verso il basso equivale a 1 volta).
- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e agitare di nuovo vigorosamente per 10 volte.
- Incubare il controllo trattato con BD MAX™ STR a temperatura ambiente per 25 minuti.
- Utilizzando la pipetta di trasferimento, trasferire 2,5 ml di controllo trattato con STR in una provetta per campione etichettata. Verificare che l'ID del campione sulla provetta per campione corrisponda all'etichetta del flaconcino di controllo.



8. Chiudere la provetta per campione con un tappo a setto blu.
9. Preparare eventuali controlli aggiuntivi da testare ripetendo i passaggi da 1 a 10.
10. Procedere alla sezione Funzionamento del sistema BD MAX™ per testare BD MAX™ MDR-TB sul sistema BD MAX™.

RISULTATI ATTESI del saggio BD MAX™ MDR-TB:

Membro del pannello	Ceppo di controllo MTB	Risultato atteso del saggio BD MAX™ MDR-TB
1	Ceppo sensibile a <i>M. tuberculosis</i>	Rilevato MTB NON rilevata resistenza a RIF/INH
2	Ceppo di <i>M. tuberculosis</i> resistente alla rifampicina (mutazione nel residuo <i>rpoB</i> 531)	Rilevato MTB Rilevata resistenza a RIF, NON rilevata resistenza a INH
3	Ceppo di <i>M. tuberculosis</i> resistente alla rifampicina (mutazione nel residuo <i>rpoB</i> 526)	Rilevato MTB Rilevata resistenza a RIF, NON rilevata resistenza a INH
4	Ceppo di <i>M. tuberculosis</i> resistente all'isoniazide (mutazione in <i>katG</i>)	Rilevato MTB NON rilevata resistenza a RIF Rilevata resistenza a INH
5	Ceppo di <i>M. tuberculosis</i> resistente all'isoniazide (mutazione nel promotore <i>inhA</i>)	Rilevato MTB NON rilevata resistenza a RIF Rilevata resistenza a INH

CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO:

Ogni lotto viene sottoposto a test interni di controllo qualità prima del rilascio. L'analisi del controllo qualità viene eseguita utilizzando un kit per la preparazione del campione e un kit PCR in tempo reale per la quantificazione. I risultati finali del controllo di qualità sono disponibili per ogni lotto.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E PROTOCOLLO DI CONVALIDA PER GLI UTENTI:

Fare riferimento alle indicazioni del kit aggiuntivo di estrazione e rilevazione.

LIMITI DEL METODO:

1. Questo reagente è destinato ad essere utilizzato con metodi di diagnostica umana. Questo test non è stato verificato con altri metodi.
2. Prima di utilizzare il kit leggere attentamente la scheda tecnica. Per ottenere risultati attendibili è importante attenersi rigorosamente al protocollo.
3. Questo prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto di tecniche molecolari.
4. Questo controllo esterno non sostituisce i controlli del kit diagnostico interno.
5. Non è possibile trarre conclusioni quantitative da un singolo campione a concentrazione nota. Una precisa quantificazione del campione clinico può essere ottenuta solo con il metodo della curva standard utilizzando un calibratore quale MBC034 AmpliRun® MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DNA CONTROL.
6. AMPLIRUN® TOTAL non è stato progettato per essere utilizzato con alcun kit diagnostico specifico di un determinato produttore. Viene utilizzato per convalidare e controllare l'elaborazione dei campioni, l'analisi e la rilevazione di una procedura funzionale del laboratorio diagnostico.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE:

• TEST D'IDENTITÀ

Un'analisi PCR è stata eseguita dopo l'estrazione con una coppia di primer specifici per *M. tuberculosis*. La reazione ha prodotto un frammento delle dimensioni attese.

• TEST DI QUANTIFICAZIONE

La quantificazione si basa su qPCR in tempo reale utilizzando il metodo della curva standard. Questo metodo prevede l'utilizzo di repliche multiple di diverse diluizioni seriali sia del prodotto sia dello standard di quantificazione.

• PRECISIONE INTRA-TEST

3 fiale del prodotto sono state estratte in identiche condizioni di estrazione e 3 repliche di ogni estrazione sono state amplificate dallo stesso operatore in identiche condizioni qPCR. Tra tutti i test è stato osservato un coefficiente di varianza inferiore al 15%.

• PRECISIONE INTER-TEST

1 flacone del prodotto è stato estratto e 3 repliche di questo flacone sono state amplificate da 2 diversi operatori per 3 giorni consecutivi. Tra tutti i test è stato osservato un coefficiente di varianza inferiore al 15%.

CONVALIDA DI BD MAX™ MDR-TB







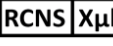


Tre lotti unici di VIRCELL TOTAL MTB CONTROL sono stati testati da due operatori BD MAX™, assegnati a due piattaforme BD MAX™, che hanno testato due diversi reagenti per il saggio BD MAX™ MDR-TB su entrambe le piattaforme BD MAX™. Tutti e tre i lotti di VIRCELL TOTAL MTB CONTROL sono stati testati su ogni esecuzione di BD MAX™. Sono stati ottenuti 12 risultati validi per ceppo nei tre lotti dei controlli. L'accordo percentuale positivo (PPA) è stato determinato come segue: $100 \times VP/VP + FN$ dove VP = Vero Positivo definito dall'identificazione di VIRCELL TOTAL MTB CONTROL e FN = Falso Negativo definito come risultato di BD MAX™ non corrispondente all'identificazione di VIRCELL TOTAL MTB CONTROL.

Membro del pannello	BD MAX™ Lotto 1 (X 2 utenti)			BD MAX™ Lotto 2 (X 2 utenti)			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: accordo percentuale positivo



SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE:

	Dispositivo medico per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Usare fino a (data di scadenza)
	Conservare a x-y°C
	Codice del lotto
	Codice del prodotto
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Ricostituire in x µl
	Temperatura di spedizione
	Temperatura di stoccaggio

BIBLIOGRAFIA:

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).

Per ulteriori informazioni contattare:

customerservice@vircell.com

EDIZIONE: 2019-01-15
L-MBTC027-IT-02

