

NOTICE of CHANGE dated 16/09/2021

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«MDR/MTB ELITe MGB Kit» Ref. RTS120ING

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following change:

- *Correction of T_m value of katG probe for INH negative resistance.*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE

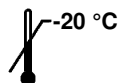
	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



MDR/MTB ELITE MGB® Kit

reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS120ING



ÍNDICE

USO PREVISTO
PRINCIPIOS DEL ENSAYO
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO
MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO
OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES
MUESTRAS Y CONTROLES
PROCEDIMIENTO
CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES
BIBLIOGRAFÍA
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO
PROBLEMAS Y SOLUCIONES
SÍMBOLOS
AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

página 1
página 2
página 2
página 3
página 3
página 3
página 4
página 5
página 7
página 15
página 28
página 29
página 30
página 31
página 32

USO PREVISTO

El «MDR/MTB ELITE MGB® Kit» es parte de un ensayo cualitativo de amplificación de los ácidos nucleicos para detectar ADN del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*) e identificar las principales mutaciones asociadas a la resistencia a la rifampicina y/o a la isoniazida.

El ensayo se debe llevar a cabo con el sistema **ELITE InGenius®**, a partir de muestras de esputo, aspirados bronquiales (AB), lavados broncoalveolares (LBA), orina, fluidos serosos, biopsias y aspirados gástricos tras haber sido licuadas, descontaminadas e inactivadas.

El producto se puede usar para dos propósitos distintos:

- como ayuda en el diagnóstico de la tuberculosis por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en asociación con los datos clínicos del paciente y otros resultados de exámenes de laboratorio, en particular los métodos de cultivo de las micobacterias,
- como ayuda en el diagnóstico de la tuberculosis y la resistencia genotípica del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en asociación con los datos clínicos del paciente y otros resultados de exámenes de laboratorio, en particular los ensayos fenotípicos para la susceptibilidad antimicrobiana.

MDR/MTB ELITE MGB® Kit

reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS120ING

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El ensayo consiste en la realización de una reacción múltiple de amplificación en tiempo real con el **ELITE InGenius**, un sistema integrado y automatizado de extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados.

Para el único propósito de detectar la tuberculosis e identificar la resistencia genotípica del complejo MTB, a partir del ADN extraído de cada muestra sometida a análisis, se realizan en la misma sesión analítica dos reacciones de amplificación, mediante las mezclas TB1 PCR Mix y TB2 PCR Mix en dos cartuchos «PCR Cassettes».

La probeta de **TB1 PCR Mix** amplifica las siguientes dianas:

- una región de secuencia repetida IS6110, detectada por una sonda específica (canal MTB), para la identificación del complejo MTB,
- la región hot spot 81 bp del gen *rpoB*, detectada por tres sondas específicas (canales *rpoB2*, *rpoB3*, *rpoB4*), para identificar la resistencia genotípica a la rifampicina.

La probeta de **TB2 PCR Mix** amplifica las siguientes dianas:

- la región hot spot 81 bp del gen *rpoB*, detectada por una sonda específica (canal *rpoB1*), para identificar la resistencia genotípica a la rifampicina,
- la región del codón 315 del gen *katG*, detectada por una sonda específica (canal *katG*), para identificar la resistencia genotípica a la isoniazida,
- la región promotora -15/-8 del gen *inhA*, detectada por una sonda específica (canal *inhA*), para identificar la resistencia genotípica a la isoniazida.

Además, el control interno exógeno se amplifica en las mezclas TB1 PCR Mix y TB2 PCR Mix. El control interno se basa en una secuencia artificial (IC2) y es detectado por una sonda específica (canal IC).

Las sondas que cuentan con la tecnología **ELITE MGB®** se activan cuando se hibridan con el producto específico de la reacción de amplificación. El instrumento mide y registra la emisión de fluorescencia.

Al final del ciclo de amplificación, el equipo **ELITE InGenius** analiza automáticamente:

- curvas de fluorescencia para calcular los «ciclos de umbral» (Ct) y detectar el complejo MTB,
- curvas de disociación para calcular las temperaturas de fusión (Tm) que permiten identificar la presencia de genes diana normales y/o mutados (*rpoB*, *katG* e *inhA*).

El ensayo se ha validado con el sistema **ELITE InGenius**, a partir de muestras de esputo, lavados broncoalveolares (LBA), aspirados bronquiales (AB), orina, fluidos serosos, biopsias y aspirados gástricos tras haber sido fluidificadas descontaminadas e inactivadas.

PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO

El producto «MDR/MTB ELITE MGB® Kit» suministra dos mezclas completas y listas para el uso para la amplificación en tiempo real: las mezclas TB1 PCR Mix y TB2 PCR Mix, cada una de ellas dosificada en cuatro probetas. Cada probeta contiene 280 µl de solución, que es suficiente para 12 pruebas en condiciones óptimas de consumo del reactivo (por lo menos 2 muestras por sesión de trabajo) cuando se usan con el sistema **ELITE InGenius**.

La mezcla **TB1 PCR Mix** contiene los primers y las sondas específicos para:

- la secuencia repetida del **complejo IS6110 MTB**. La sonda (MTB) se marca con el fluoróforo FAM, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva con un quencher no fluorescente,
- la región hot-spot 81 bp del gen *rpoB*. Las sondas (*rpoB2*, *rpoB3* y *rpoB4*) se marcan con los fluoróforos AP639, AP525 y AP593 respectivamente, se estabilizan mediante el grupo MGB® y se inactivan con un quencher no fluorescente,
- la secuencia artificial **IC2** de control interno. La sonda (IC) se marca con el fluoróforo AP680, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva con un quencher no fluorescente.

La mezcla de **PCR TB2** contiene los primers y la sonda específicos para:

- la región hot-spot 81 bp del gen *rpoB*. La sonda (*rpoB1*) se marca con el fluoróforo AP639, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva con un quencher no fluorescente,
- la región del codón 315 del gen *katG*. La sonda (*katG*) se marca con el fluoróforo FAM, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva con un quencher no fluorescente,

MDR/MTB ELITe MGB® Kit
reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS120ING

- la región -15/-8 del promotor del gen **inhA**. La sonda (inhA) se marca con el fluoróforo AP593, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva con un quencher no fluorescente,
- la secuencia artificial **IC2** de control interno. La sonda (IC) se marca con el fluoróforo AP680, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva con un quencher no fluorescente.

Las mezclas PCR TB1 y TB2 contienen buffer, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos, estabilizadores y la enzima ADN polimerasa de activación térmica (hot start).

El producto permite efectuar **48 pruebas en asociación con el sistema ELITe InGenius**, incluyendo los controles.

MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de riesgos
Mezcla de PCR TB1	Mezcla completa de reacción Tapa ROJA	4 x 280 µl	-
Mezcla de PCR TB2	Mezcla completa de reacción Tapa BLANCA	4 x 280 µl	-

MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Mezclador vórtex.
- Microcentrifugadora de mesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosol o de dispensación positiva (2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl).
- Agua de grado molecular para biología.

OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS

Los reactivos para la extracción del ADN de las muestras por analizar, el control interno de extracción e inhibición, el control positivo de amplificación y los consumibles **no** se suministran con este producto.

Para la ejecución automática de la extracción del ADN, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados de las muestras, se requieren el equipo «**ELITe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) y los siguientes protocolos de ensayo específicos:

parámetros para el control positivo de amplificación «**MDR-MTB ELITe_PC**»,

- parámetros para el control negativo de amplificación «**MDR-MTB ELITe_NC**»,
- parámetros para las muestras que someterán a análisis «**MDR-MTB ELITe_SP_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_BAL_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_U_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_CL_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_B_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_GA_200_100**».

Con el equipo «**ELITe InGenius**» se requieren los siguientes productos genéricos:

- cartuchos de extracción «**ELITe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumibles para extracción y amplificación «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS),
- cartuchos de amplificación «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR),
- puntas «**300 µL Filter tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),
- cajas «**ELITe InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000).

MDR/MTB ELITe MGB® Kit
reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS120ING

Como plantilla de control interno de extracción e inhibición, se requiere el producto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE). Se trata de una solución estabilizada que contiene ADN plasmídico y bacteriófago con genoma de ARN.

Como plantilla de control positivo de amplificación, se requiere el producto específico «**MDR/MTB - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR120ING). Se trata de una solución estabilizada de ADN plasmídico.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto es para uso exclusivo *in-vitro*.

Advertencias y precauciones generales

Las muestras clínicas de los pacientes con sospecha de tuberculosis deben manipularse conforme a las reglamentaciones locales o estatales en materia de seguridad (ambiente de trabajo y formación del personal).

Las muestras clínicas de los pacientes con sospecha de tuberculosis deben inactivarse antes del uso junto al sistema ELITe InGenius.

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si fueran potencialmente infecciosas. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Los materiales que entran en contacto con las muestras biológicas deben descontaminarse en autoclave durante una hora a 121 °C antes de la eliminación.

Manipular y eliminar todos los reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si fueran potencialmente infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Los residuos deben tratarse y eliminarse cumpliendo con las normas de seguridad pertinentes. El material desechable combustible debe ser incinerado. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de desecharlos.

Usar indumentaria de protección y guantes adecuados y protegerse los ojos y la cara.

No pipetear ninguna solución con la boca.

No comer, beber, fumar ni aplicarse cosméticos en el área de trabajo.

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos conforme a las normas vigentes.

Antes de realizar el ensayo, leer atentamente todas las instrucciones facilitadas con el producto.

Durante la realización del ensayo, respetar las instrucciones incluidas con el producto.

Respetar la fecha de caducidad del producto.

Utilizar únicamente los reactivos presentes en el producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

Para los procedimientos de biología molecular se requiere personal cualificado para evitar el riesgo de resultados incorrectos, especialmente debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o la contaminación de las mismas con productos de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos específicos para las sesiones de trabajo.

Las muestras deben ser adecuadas y destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras inactivas deben ser manipuladas bajo una cabina de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizar puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles, libres de ADNasa y ARNasa, ADN y ARN.

Los cartuchos de PCR deben manipularse evitando la dispersión del producto de amplificación en el entorno para que no se produzcan contaminaciones de muestras y reactivos.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes

Las **TB1 PCR Mix** y **TB2 PCR Mix** se deben conservar a -20 C en un lugar oscuro.

Las **TB1 PCR Mix** y **TB2 PCR Mix** se pueden congelar y descongelar un máximo de **siete veces**: más ciclos de congelación/descongelación pueden provocar una pérdida de las prestaciones del producto.

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe ser utilizado con las siguientes muestras clínicas:

Muestras de esputo

Las muestras de esputo para la extracción de ADN deben ser recolectadas e identificadas según las instrucciones del laboratorio de micobacteriología, y transportadas y conservadas a +2/+8°C por un máximo de dos días. Las muestras deben licuarse con una solución de N-acetil L-cisteína y descontaminarse con una solución de hidróxido de sodio (Manual para laboratorios de micobacteriología, Global Laboratory Initiative). La muestra licuada y descontaminada deberá inactivarse entonces a 9 °C durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, se deben transferir 0,2 ml de la muestra inactiva al «**tubo de sonicación**» suministrado con el «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**».

Las muestras de esputo licuadas y descontaminadas pueden congelarse y conservarse a -20°C durante máximo un mes, o a -70°C por períodos más prolongados. Evitar los ciclos de congelación/descongelación.

Nota: Para llevar a cabo la extracción de ADN de las muestras de esputo con el **ELITe InGenius** y el **ELITe InGenius Software** versión 1.3 (o versiones posteriores), utilice el protocolo de ensayo **MDR-MTB ELITe_SP_200_100**. Este protocolo procesa 200 µl de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µl/extracción, y lixivia los ácidos nucleicos en 100 µl.

Lavado broncoalveolar (LBA), aspirados bronquiales (AB)

Las muestras de LBA/AB para la extracción de ADN deben ser recolectadas e identificadas según las instrucciones del laboratorio de micobacteriología, y transportadas y conservadas a +2/+8°C por un máximo de dos días. Las muestras deben licuarse con una solución de N-acetil L-cisteína y descontaminarse con una solución de hidróxido de sodio (Manual para laboratorios de micobacteriología, Global Laboratory Initiative). La muestra licuada y descontaminada deberá inactivarse entonces a 95 C durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, se deben transferir 0,2 ml de la muestra inactiva al «**tubo de sonicación**» suministrado con el «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**».

Las muestras de LBA/AB licuadas y descontaminadas pueden congelarse y conservarse a -20 C durante máximo un mes, o a -70 C por períodos más prolongados. Evitar los ciclos de congelación/descongelación.

Nota: Para llevar a cabo la extracción de ADN de las muestras de LBA/AB con el **ELITe InGenius** y el **ELITe InGenius Software** versión 1.3 (o versiones posteriores), utilice el protocolo de ensayo **MDR-MTB ELITe_BAL_200_100**. Este protocolo procesa 200 µl de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µl/extracción, y lixivia los ácidos nucleicos en 100 µl.

Orina

Las muestras de orina para la extracción de ADN deben ser recolectadas e identificadas según las instrucciones del laboratorio de micobacteriología, y transportadas y conservadas a +2/+8 C por un máximo de dos días. Las muestras se deben concentrar y descontaminar con una solución de hidróxido de sodio (Manual para laboratorios de micobacteriología, Global Laboratory Initiative). La muestra concentrada y descontaminada se debe inactivar sucesivamente a 95 C durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, se deben transferir 0,2 ml de la muestra inactiva al «**tubo de sonicación**» suministrado con el «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**».

Las muestras de orina concentradas y descontaminadas pueden congelarse y conservarse a -20 C durante máximo un mes, o a -70 C por períodos más prolongados. Evitar los ciclos de congelación/descongelación.

Nota: Para llevar a cabo la extracción del ADN de las muestras de orina con el **ELITe InGenius** y el **ELITe InGenius Software** versión 1.3 (o versiones posteriores), utilice el protocolo de ensayo **MDR-MTB ELITe_U_200_100**. Este protocolo procesa 200 µl de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µl/extracción, y lixivia los ácidos nucleicos en 100 µl.

Fluidos serosos

Las muestras de fluidos serosos para la extracción de ADN deben ser recolectadas e identificadas según las instrucciones del laboratorio de micobacteriología, y transportadas y conservadas a +2/+8°C por un máximo de dos días. Las muestras se deben concentrar y descontaminar con una solución de hidróxido de sodio (Manual para laboratorios de micobacteriología, Global Laboratory Initiative). La muestra concentrada y descontaminada se debe inactivar sucesivamente a 95°C durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, se deben transferir 0,2 ml de la muestra inactiva al «**tubo de sonicación**» suministrado con el «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**».

Las muestras de fluidos serosos licuadas y descontaminadas pueden congelarse y conservarse a -20°C durante máximo un mes, o a -70°C por períodos más prolongados. Evitar los ciclos de congelación/descongelación.

Nota: Para llevar a cabo la extracción del ADN de las muestras de fluidos serosos con el **ELITe InGenius** y el **ELITe InGenius Software** versión 1.3 (o versiones posteriores), utilice el protocolo de ensayo **MDR-MTB ELITe_CL_200_100**. Este protocolo procesa 200 µl de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µl/extracción, y lixivia los ácidos nucleicos en 100 µl.

Biopsias

Las muestras de biopsias para la extracción de ADN deben ser recolectadas e identificadas según las instrucciones del laboratorio de micobacteriología, y transportadas y conservadas a +2/+8°C por un máximo de dos días. Fragmente las muestras conforme a los procedimientos del laboratorio y descontamínelas con una solución de hidróxido de sodio (Manual para laboratorios de micobacteriología, Global Laboratory Initiative). La muestra descontaminada deberá inactivarse entonces a 95°C durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, se deben transferir 0,2 ml de la muestra inactiva al «**tubo de sonicación**» suministrado con el «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**».

Las muestras de biopsias descontaminadas pueden congelarse y conservarse a -20°C durante máximo un mes, o a -70°C por períodos más prolongados. Evitar los ciclos de congelación/descongelación.

Nota: Para llevar a cabo la extracción del ADN de las muestras de biopsias con el **ELITe InGenius** y el **ELITe InGenius Software** versión 1.3 (o versiones posteriores), utilice el protocolo de ensayo **MDR-MTB ELITe_B_200_100**. Este protocolo procesa 200 µl de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µl/extracción, y lixivia los ácidos nucleicos en 100 µl.

Aspirados gástricos

Las muestras de aspirados gástricos para la extracción de ADN deben ser recolectadas e identificadas según las instrucciones del laboratorio de micobacteriología, y transportadas y conservadas a +2/+8 C por un máximo de dos días. Las muestras deben licuarse con una solución de N-acetil L-cisteína y descontaminarse con una solución de hidróxido de sodio (Manual para laboratorios de micobacteriología, Global Laboratory Initiative). La muestra licuada y descontaminada deberá inactivarse entonces a 95 C durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, se deben transferir 0,2 ml de la muestra inactiva al «**tubo de sonicación**» suministrado con el «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**».

Las muestras de aspirados gástricos licuadas y descontaminadas pueden congelarse y conservarse a -20 C durante máximo un mes, o a -70 °C por períodos más prolongados. Evitar los ciclos de congelación/descongelación.

Nota: Para llevar a cabo la extracción del ADN de las muestras de aspirados gástricos con el **ELITe InGenius** y el **ELITe InGenius Software** versión 1.3 (o versiones posteriores), utilice el protocolo de ensayo **MDR-MTB ELITe_GA_200_100**. Este protocolo procesa 200 µl de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µl/extracción, y lixivia los ácidos nucleicos en 100 µl.

Sustancias interferentes

Los datos disponibles relacionados con la inhibición causada por medicamentos y otras sustancias se indican en la sección «Sustancias interferentes» en el capítulo «Características de las prestaciones».

Controles de la amplificación

Antes de analizar una muestra, es obligatorio preparar y aprobar los controles de amplificación correspondientes para el lote de reactivos de amplificación que se desea utilizar en el ensayo:

- Como control positivo de amplificación, utilice el reactivo **TB Positive Control** (no incluido en el kit) junto con el protocolo **MDR-MTB ELITe_PC**,
- Como control negativo de amplificación (**TB Negative Control**), utilice agua de grado molecular para biología (no incluida en el kit) junto con el protocolo **MDR-MTB ELITe_NC**.

Nota: El sistema **ELITe InGenius** requiere resultados aprobados y válidos de los controles de amplificación para cada lote de reactivos guardado en su base de datos.

Los resultados de los controles de amplificación, aprobados y guardados en la base de datos, caducan **después de 15 días**. Al vencimiento, es necesario realizar de nuevo el análisis de los controles positivos y negativos con el lote de reactivo de amplificación.

Los controles de amplificación deben repetirse también cuando:

- se utiliza un nuevo lote de reactivos de amplificación,
- los resultados de los análisis de control (consulte el apartado siguiente) se encuentran fuera de las especificaciones,
- se realiza el mantenimiento del equipo **ELITe InGenius**.

Controles de calidad

Se recomienda convalidar periódicamente todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación. Se pueden utilizar muestras ya analizadas o material de referencia certificado.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento de uso del producto **MDR/MTB ELITe MGB® Kit** con el sistema **ELITe InGenius** comprende tres fases:

- Comprobación de la preparación del sistema
- Configuración de la sesión
- Evaluación y aprobación de los resultados

Comprobación de la preparación del sistema

Antes de iniciar la sesión, haciendo referencia a la documentación del equipo, es necesario:

- Encender el equipo **ELITe InGenius** y acceder al sistema en el modo «**CLOSED**».
- Comprobar que los controles de amplificación (controles, control positivo TB, control negativo TB) se hayan realizado junto con el lote de reactivo de amplificación pertinente y que los resultados se hayan aprobado y validado (Status). Si no se dispone de resultados aprobados o válidos de los controles de amplificación, es necesario generarlos tal como se indica en los siguientes apartados.
- Seleccionar el tipo de ciclo, siguiendo las instrucciones de la interfaz gráfica de usuario (GUI) para configurar la ejecución utilizando los protocolos de ensayo suministrados por ELITechGroup S.p.A. Estos protocolos IVD se han validado específicamente con los productos **ELITe MGB® kit**, el equipo **ELITe InGenius** y la matriz indicada.

Los protocolos de ensayo disponibles con el producto **MDR/MTB ELITe MGB® Kit** se describen en la siguiente tabla:

Protocolo de ensayo para el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit para la detección de la tuberculosis y la identificación de resistencia genotípica del complejo MTB			
Nombre	Matriz	Tasa de unidad	Características
MDR-MTB ELITe_SP_200_100	Espuito	Positivo / negativo / resistencia positiva / resistencia negativa	Volumen de extracción de entrada: 200 µl Volumen del eluato extraído: 100 µl Control interno: 10 µl Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µl Volumen de la muestra de PCR de entrada: 20 µl
MDR-MTB ELITe_BAL_200_100	LBA/AB	Positivo / negativo / resistencia positiva / resistencia negativa	Volumen de extracción de entrada: 200 µl Volumen del eluato extraído: 100 µl Control interno: 10 µl Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µl Volumen de la muestra de PCR de entrada I: 20 µl

MDR-MTB ELITe_U_200_100	Orina	Positivo / negativo / resistencia positiva / resistencia negativa	Volumen de extracción de entrada: 200 µl Volumen del eluato extraído: 100 µl Control interno: 10 µl Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µl Volumen de la muestra de PCR de entrada: 20 µl
MDR-MTB ELITe_CL_200_100	Fluidos serosos	Positivo / negativo / resistencia positiva / resistencia negativa	Volumen de extracción de entrada: 200 µl Volumen del eluato extraído: 100 µl Control interno: 10 µl Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µl Volumen de la muestra de PCR de entrada: 20 µl
MDR-MTB ELITe_B_200_100	Biopsias	Positivo / negativo / resistencia positiva / resistencia negativa	Volumen de extracción de entrada: 200 µl Volumen del eluato extraído: 100 µl Control interno: 10 µl Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µl Volumen de la muestra de PCR de entrada: 20 µl
MDR-MTB ELITe_GA_200_100	Aspirados gástricos	Positivo / negativo / resistencia positiva / resistencia negativa	Volumen de extracción de entrada: 200 µl Volumen del eluato extraído: 100 µl Control interno: 10 µl Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µl Volumen de la muestra de PCR de entrada: 20 µl

Nota: En ensayos para la detección de la tuberculosis y la identificación de la resistencia genotípica del complejo MTB, se requieren las mezclas **TB1 PCR Mix** y **TB2 PCR Mix**.

Si el protocolo de ensayo deseado no está cargado en el sistema, contactar con el Servicio de atención al cliente de ELITechGroup S.p.A. más cercano.

Configuración de la ejecución

El producto **MDR/MTB ELITe MGB® Kit** puede usarse con el sistema **ELITe InGenius** para realizar:

- Ciclo integrado (Extracción + PCR)
- Ciclo de amplificación (solo PCR)
- Ciclo de amplificación para el control positivo y el control negativo (solo PCR)

Todos los parámetros necesarios para la ejecución están incluidos en el protocolo de ensayo disponible en el equipo y se abren automáticamente al seleccionar el protocolo de ensayo.

Nota: El sistema **ELITe InGenius** se puede conectar al «Laboratory Information Server» (LIS) mediante el cual se puede enviar la información de configuración de la ejecución. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del equipo.

Los pasos principales para la configuración de los tres tipos de ciclo se describen a continuación.

A. Ciclo integrado

Para configurar el ciclo integrado con la extracción y amplificación de la muestra, llevar a cabo el procedimiento indicado en la interfaz:

1. Descongelar las probetas que contienen la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix. Una probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo del reactivo (por lo menos 2 muestras por sesión de trabajo). Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar las probetas que contienen la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix en un lugar oscuro, puesto que los reactivos son sensibles a la luz.

2. Descongelar las probetas de CPE para la ejecución. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar delicadamente y centrifugar las probetas durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado en 200 µl, y «Extracted Elute Volume», en 100 µl.
5. Para cada «Track» deseado, completar el «SampleID» (SID) tecleando o escaneando el código de barras de la muestra.
6. Seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar en la columna «Assay» (por ejemplo: MDR-MTB ELITe_SP_200_100).
7. Asegurarse de que el «Protocolo» que se muestra sea: «Extract + PCR».
8. Seleccionar la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» y seleccionar «Extraction Tube». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar el CPE y la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix en el «Inventory Block» seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para proseguir con la configuración.
10. Cargar y revisar los racks de puntas en la «Inventory Area» seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para proseguir con la configuración.
11. Cargar los cartuchos «PCR Cassette», los cartuchos de extracción «ELITe InGenius SP 200», todos los consumibles y las muestras por extraer, siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cerrar la puerta del equipo.
13. Presionar «Start» para iniciar la ejecución.

Una vez finalizado el proceso, el sistema **ELITe InGenius** permite visualizar, aprobar y memorizar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: Al final del ciclo, la muestra extraída que ha quedado en el «Elution Tube» debe sacarse del equipo, taparse, identificarse y guardarse a -20°C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: Al final del ciclo, los cartuchos «PCR Cassette» con los productos de reacción y los consumibles deben sacarse del equipo y eliminarse sin que se produzcan contaminaciones ambientales. Evitar la dispersión de los productos de reacción.

Nota: Las mezclas de PCR se pueden conservar en el bloque refrigerado hasta 7 sesiones de trabajo de 3 horas cada una.

B. Ciclo de amplificación

Para configurar un ciclo de amplificación a partir de los ácidos nucleicos extraídos, seguir las instrucciones de la interfaz:

1. Descongelar las probetas que contienen la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix. Una probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo del reactivo (por lo menos 2 muestras por sesión de trabajo). Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar las probetas que contienen la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix en un lugar oscuro, puesto que los reactivos son sensibles a la luz.

2. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
3. Aunque no se vaya a realizar la extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado en 200 µl, y «Extracted Elute Volume», en 100 µl.
4. Para cada «Track» deseado, completar el SID tecleando o escaneando el código de barras de la muestra.
5. Seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar en la columna «Assay» (por ejemplo: MDR-MTB ELITe_SP_200_100).
6. Seleccionar «PCR Only» en la columna «Protocol».
7. Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» sea «Elution Tube (fila de abajo)». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix en el «Inventory Block» seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar los racks de puntas en la «Inventory Area» seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar los cartuchos «PCR Cassette» y las muestras de los ácidos nucleicos extraídos siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cerrar la puerta del equipo.
12. Presionar «Start» para iniciar la ejecución.

Una vez finalizado el proceso, el sistema **ELITe InGenius** permite visualizar, aprobar y memorizar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: Al final del ciclo, la muestra extraída que ha quedado en el «Elution Tube» debe sacarse del equipo, taparse y guardarse a -20 C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: Al final del ciclo, los cartuchos «PCR Cassette» con los productos de reacción y los consumibles deben sacarse del equipo y eliminarse sin que se produzcan contaminaciones ambientales. Evitar la dispersión de los productos de reacción.

Nota: Las mezclas de PCR se pueden conservar en el bloque refrigerado hasta 7 sesiones de trabajo de 3 horas cada una.

C. Ciclo de amplificación para los controles positivo y negativo

Para configurar el ciclo de amplificación para el control positivo y el control negativo, llevar a cabo el procedimiento indicado en la interfaz:

1. Descongelar las probetas que contienen la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix. Una probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo del reactivo (por lo menos 2 muestras por sesión de trabajo). Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar las probetas que contienen la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix en un lugar oscuro, puesto que los reactivos son sensibles a la luz.

2. Descongelar el tubo de control positivo TB para la ejecución. Cada probeta es suficiente para 2 ejecuciones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 100 µl de agua de grado molecular para biología en un tubo de elución suministrado con el ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Aunque no se vaya a realizar la extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado en 200 µl, y «Extracted Elute Volume», en 100 µl.
6. Desde el «Track» deseado, seleccionar el protocolo de ensayo de la prueba que se va a utilizar en la columna «Assay».
7. Para el control positivo, seleccionar MDR-MTB ELITe_PC en la columna «Assay» e introducir el número de lote y la fecha de caducidad del control positivo TB.
8. Para el control negativo, seleccionar MDR-MTB ELITe_NC en la columna «Assay» e introducir el número de lote y la fecha del agua de grado molecular para biología.
9. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix en el «Inventory Block» seleccionando siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar y revisar los racks de puntas en la «Inventory Area» seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar los cartuchos «PCR Cassettes», el tubo del control positivo TB y el tubo del control negativo siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del equipo.
14. Presionar «Start» para iniciar la ejecución.

Una vez finalizado el proceso, el sistema **ELITe InGenius** permite visualizar, aprobar y memorizar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: Al final del ciclo, el control positivo restante debe sacarse del equipo, taparse y conservarse a -20°C. Evitar cualquier derrame del control positivo. El control negativo restante debe eliminarse.

Nota: Al final del ciclo, los cartuchos «PCR Cassette» con los productos de reacción y los consumibles deben sacarse del equipo y eliminarse sin que se produzcan contaminaciones ambientales. Evitar la dispersión de los productos de reacción.

Nota: Las mezclas de PCR se pueden conservar en el bloque refrigerado hasta 7 sesiones de trabajo de 3 horas cada una.

Evaluación y aprobación de los resultados

Al final del ciclo, aparece automáticamente la pantalla «Results Display». En esta pantalla se muestran los resultados de la muestra/control y la información sobre el ciclo. Desde esta pantalla se puede aprobar el resultado, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del equipo.

Nota: El sistema **ELITe InGenius** se puede conectar al «Location Information Server» (LIS) mediante el cual se pueden enviar los resultados de la sesión de trabajo al centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del equipo.

Detección de la tuberculosis e identificación de resistencia genotípica del complejo MTB

El sistema **ELITe InGenius** genera los resultados con el producto **MDR/MTB ELITe MGB® Kit** mediante el siguiente procedimiento:

- A. Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación
- B. Validación de los resultados de las muestras
- C. Generación del informe de los resultados de la muestra

A. Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación

Las señales de fluorescencia emitidas por las sondas diana (MTB, rpoB1, rpoB2, rpoB3, rpoB4, katG e inhA) en las reacciones de amplificación del control positivo y del control negativo son analizadas automáticamente e interpretadas por el software del equipo con los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «MDR-MTB ELITe_PC» y «MDR-MTB ELITe_NC».

Los resultados de la amplificación del control positivo y del control negativo, específicos para el lote del reactivo de amplificación, se guardan en la base de datos (Controls). El personal cualificado como «Administrator» o «Analyst» puede ver dichos resultados y aprobarlos siguiendo las instrucciones de la interfaz.

Nota: El control positivo y el control negativo se procesan junto con las mezclas de PCR TB1 y TB2, por lo que los resultados del control deben estar aprobados para ambas mezclas. Por defecto, la interfaz muestra los resultados del control para la mezcla de PCR TB1 (Controls). Si se hace clic en el campo de ensayo, la ventana de ensayo se abre y la mezcla de PCR TB2 se puede seleccionar para aprobar los correspondientes resultados del control.

Los resultados de la amplificación del control positivo y del control negativo, específicos para el lote de reactivo de amplificación, caducan **al cabo de 15 días**.

El software del equipo utiliza los resultados de los ciclos de amplificación del control positivo y del control negativo para configurar los «Control Charts». Se requieren al menos cuatro resultados del control positivo y del control negativo de cuatro ciclos distintos. Los resultados posteriores de los controles positivos y negativos se utilizan para monitorizar las prestaciones del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del equipo.

Nota: Si el resultado de los controles positivo o negativo de la amplificación no cumple los criterios de aceptación, el equipo muestra el mensaje «Failed» en la pantalla «Controls» y no es posible aprobarlo. En este caso, deben repetirse las reacciones de amplificación de los controles positivo o negativo.

Nota: Si el control positivo o el control negativo se procesan junto con las muestras que se van a analizar y el resultado no es válido, se invalida la ejecución entera. En este caso, también debe repetirse la amplificación de todas las muestras.

B. Validación de los resultados de las muestras

Las señales de fluorescencia emitidas por las sondas diana (MTB, rpoB1, rpoB2, rpoB3, rpoB4, katG, inhA) y por la sonda de control interno (IC) en las reacciones de amplificación de la muestra son analizadas automáticamente e interpretadas por el software del equipo con los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo MDR-MTB ELITe_SP_200_100, MDR-MTB ELITe_BAL_200_100, MDR-MTB ELITe_U_200_100, MDR-MTB ELITe_CL_200_100, MDR-MTB ELITe_B_200_100, MDR-MTB ELITe_GA_200_100.

Los resultados se muestran en los informes generados por el equipo («Result Display»).

El ciclo de la muestra se puede aprobar cuando se cumplen las dos condiciones que se indican en la siguiente tabla.

1) Control positivo	Estado
TB Positive Control	APROBADO
2) Control negativo	Estado
TB Negative Control	APROBADO

Para cada muestra, el resultado del ensayo es interpretado automáticamente por el sistema a partir de los valores Ct (para el complejo MTB y el control interno) y los valores Tm (para el MTB y el análisis de resistencia) según lo establecen el algoritmo del **software ELITe InGenius** y los parámetros del protocolo de ensayo.

En la tabla que aparece abajo se indican los posibles mensajes para el resultado de la detección del complejo MTB.

Resultado de una sesión de la muestra	Interpretación
MTB DNA Detected. Typing as follow:	Se ha detectado ADN del complejo MTB en la muestra en cantidad suficiente para poder realizar el análisis de resistencia al antibiótico (véase la siguiente tabla).
MTB DNA Detected. Typing not feasible.	Se ha detectado ADN del complejo MTB en la muestra pero en cantidad no suficiente para poder realizar el análisis de resistencia al antibiótico.
MTB DNA Not Detected or below LoD.	No se ha detectado ADN del complejo MTB en la muestra. La muestra es válida negativa o la concentración diana está por debajo del límite de detección (LoD) del ensayo.
Invalid - Retest Sample.	Resultado del ensayo no válido debido a problemas con el control interno (extracción incorrecta o presencia de inhibidores). Es necesario repetir la prueba.
Inconclusive – Retest Sample.	Resultado del ensayo no determinado debido a problemas en la detección del complejo MTB. Es necesario repetir la prueba.

Los posibles mensajes correspondientes al resultado del análisis de la resistencia al antibiótico de la muestra se indican en la siguiente tabla.

Resultado de una sesión de la muestra	Interpretación
RIF Resistance Negative	No se han detectado mutaciones en la región del gen rpoB sometida a prueba. La muestra podría ser sensible a la rifampicina .
RIF Resistance Positive: Probe/s	Se han detectado mutaciones en la región del gen rpoB sometida a prueba. La muestra podría ser resistente a la rifampicina . Las sondas que han detectado la mutación se indican en los resultados.
INH Resistance Negative	No se han detectado mutaciones en las regiones de los genes katG e inhA sometidas a prueba. La muestra podría ser sensible a la isoniazida .
INH Resistance Positive: Probe/s	Se han detectado mutaciones en las regiones de los genes katG e inhA sometidas a prueba. La muestra podría ser resistente a la isoniazida . Las sondas que han detectado la mutación se indican en los resultados.
RIF Typing Invalid - Retest Sample.	Resultado del ensayo no válido debido a problemas en el análisis de resistencia al antibiótico. Es necesario repetir la prueba.
INH Typing Invalid - Retest Sample.	

Cuando se detecta ADN del complejo MTB en la muestra y se realiza en análisis de resistencia al antibiótico, los mensajes de los resultados pueden presentarse en distintas combinaciones (por ej., MTB DNA Detected. Typing as follow: RIF Resistance Negative, INH Resistance Positive: katG, inhA).

Las muestras indicadas como «MTB DNA Detected. Typing not feasible» por el **software ELITe InGenius** no son aptas para el análisis de la resistencia al antibiótico. En este caso, el ADN MTB se ha detectado pero no es suficiente (MTB Ct > 31) para obtener resultados correctos de forma reproducible. Esto se debe a una concentración baja del MTB en la muestra o a problemas en la amplificación o en el paso de extracción (degradación del ADN, pérdida del mismo durante la extracción o presencia de inhibidores en el extracto).

Nota: Cuando una muestra se indica como «MTB DNA Detected. Typing not feasible», el operador puede verificar la Tm de las sondas diana (rpoB1, rpoB2, rpoB3, rpoB4, katG, inhA). Si todos los valores de Tm están dentro de los límites que se indican en la siguiente tabla para genes de tipo natural, la muestra será «RIF Resistance Negative» e «INH Resistance Negative».

Probe	Límites de Tm de tipo natural	Resultado
rpoB1	66,0 ≤ Tm ≤ 80,0	RIF Resistance Negative
rpoB2	70,0 ≤ Tm ≤ 80,0	
rpoB3	68,0 ≤ Tm ≤ 80,0	
rpoB4	63,5 ≤ Tm ≤ 80,0	
katG	70,0 ≤ Tm ≤ 80,0	INH Resistance Negative
inhA	66,0 ≤ Tm ≤ 80,0	

Las muestras que el **software ELITe InGenius** indica como «Invalid - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de los resultados. En este caso, el ADN del control interno no ha podido detectarse correctamente debido a problemas en la amplificación o en el paso de extracción (degradación del ADN, pérdida del mismo durante la extracción o presencia de inhibidores en el extracto), que pueden dar lugar a resultados incorrectos.

Las muestras que el **software ELITe InGenius** indica como «Inconclusive - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de los resultados. En este caso, se ha producido un error en la detección del ADN del complejo MTB debido a problemas en el paso de extracción o de amplificación (presencia de inhibidores en el extracto, confusión de las mezclas de PCR), que pueden dar lugar a resultados incorrectos.

Las muestras que el **software ELITe InGenius** indica como «RIF Typing Invalid - Retest Sample» e «INH Typing Invalid - Retest Sample» no son aptas para el análisis de la resistencia al antibiótico. En este caso, se ha producido un error en la detección de la resistencia al antibiótico debido a problemas en el paso de extracción o de amplificación (presencia de inhibidores en el extracto, problemas durante la configuración de la PCR), que pueden dar lugar a resultados incorrectos. Sin embargo, **las muestras son positivas para el ADN del complejo MTB**.

Si el volumen del extracto es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse mediante un ciclo de amplificación en el modo «PCR Only» "tal cual" o diluido 1:3 en agua de grado molecular para biología. Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra puede volver a analizarse a partir de la extracción de una nueva porción en el modo «Extract + PCR».

Las muestras que el **software ELITe InGenius** indica como «MTB DNA detected Typing as follows: RIF Resistance Positive: rpoB2, rpoB3, rpoB4, rpoB1» no son aptas para el análisis de la resistencia al antibiótico ya que no es correcto detectar mutaciones para todas las sondas rpoB. En este caso, el ADN MTB se ha detectado pero la amplificación del gen rpoB fue inhibida, que causan resultados incorrectos. Sin embargo, **las muestras son positivas para el ADN del complejo MTB**.

Si el volumen del extracto es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse mediante un ciclo de amplificación en el modo «PCR Only» "tal cual" o diluido 1:10 en agua de grado molecular para biología. Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra puede volver a analizarse a partir de la extracción de una nueva porción en el modo «Extract + PCR».

Nota: Tenga en cuenta que, cuando se requiere la repetición de una prueba, el ensayo se lleva a cabo con la mezcla de PCR tanto TB1 como TB2, por lo que el volumen del extracto debe ser suficiente para dos reacciones (por lo menos 50 µl).

Las muestras que se indican como: «MTB DNA Not Detected or below the LoD» son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar el ADN del complejo MTB. En este caso no se puede descartar que el ADN del complejo MTB esté presente en una concentración por debajo del límite de detección del ensayo (ver «Características de las prestaciones»).

Nota: Los resultados obtenidos con este ensayo se deben interpretar teniendo en cuenta todos los datos clínicos y demás resultados de las pruebas de laboratorio que conciernen al paciente, en particular los ensayos fenotípicos para la susceptibilidad antimicrobiana.

Los resultados del ciclo de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados (Result Display) por personal cualificado como «Administrator» o «Analyst», siguiendo las instrucciones de la interfaz. Desde la ventana «Result Display» se pueden imprimir y guardar los resultados del ciclo de la muestra como «Sample Report» y «Track Report».

C. Generación del informe de los resultados de la muestra

Los resultados de la muestra se guardan en la base de datos y pueden exportarse como «Sample Report» y «Track Report».

En «Sample Report» se muestran los detalles de una sesión de trabajo clasificada según la muestra seleccionada (SID).

En «Track Report» se muestran los detalles de una sesión de trabajo clasificada mediante el Track seleccionado.

El personal autorizado puede imprimir y firmar el «Sample Report» y el «Track Report».

CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES

Límite de detección (LoD)

El límite de detección (LoD) del producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit se ha determinado en asociación con las muestras de esputo fluidificadas, descontaminadas e inactivas y con el sistema ELITe InGenius.

El límite de detección se ha calculado probando un panel de muestras de esputo certificadas como negativas al MTB y positividad con material de referencia de *Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37Ra (ATCC), cuantificado mediante amplificación en tiempo real. Se prepararon nueve niveles de diluciones de *Mycobacterium tuberculosis*, de 320 CFU/ml a 1 CFU/ml. Cada nivel de dilución se probó en 12 réplicas en el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

La LoD se calculó usando la regresión de Probit como la concentración que tiene una probabilidad del 95% de ser positiva. La LoD estimada se verificó mediante el análisis de 20 réplicas de muestras de esputo enriquecidas con material de referencia de MTB en la concentración declarada. Además, la misma LD se verificó también para la matriz BAL/BA mediante el análisis de 20 réplicas de muestras BAL/BA enriquecidas con material de referencia de MTB en la concentración declarada. Los resultados obtenidos apoyan la LoD declarada.

La LoD asociada a las muestras de líquido cavitario, orina y biopsia se verificó mediante el análisis de 20 réplicas de cada matriz enriquecidas con material de referencia de MTB en una concentración de 20 CFU/mL. Los resultados obtenidos apoyan la supuesta LoD.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Límite de detección para las muestras de esputo con el sistema ELITe InGenius			
Matriz	LoD (CFU/mL)	Intervalo de confianza 95% (CFU/ml)	
		Límite inferior	Límite superior
Esputo	6	4	15
BAL / BA	6	-	-
líquido cavitario	20	-	-
Orine	20	-	-
Biopsia	20	-	-

Detección de la resistencia a la rifampicina y/o a la isoniazida

La detección de la resistencia a la rifampicina y/o a la isoniazida mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit usado junto con el sistema ELITe InGenius se ha evaluado analizando muestras certificadas de ADN genómico de aislados de complejo MTB resistente al antibiótico (suministrados por un laboratorio externo) y caracterizados por las mutaciones indicadas en la siguiente tabla.

Mutaciones en la región hot spot 81 bp del gen rpoB (enumeración de los codones de <i>E. coli</i>)
Q510L, L511P, L511R, Q513L, Q513P, M515I, D516V, D516Y, D516G, Q517P, S522L, S522P, H526L, H526Y, H526D, H526N, H526R, H526C, H526P, S531L, S531W, A532V, L533P
Mutaciones en la región del codón 315 del gen katG
S315N, S315T
Mutaciones en la región promotora del gen inhA
-15T, -8A, -8C, -7A

Las muestras de ADN extraído se diluyeron y se analizaron en asociación con el sistema ELITe InGenius en modo «PCR Only».

Todos los aislados se detectaron como positivos al MTB y se tipificaron correctamente como resistentes a la rifampicina y/o a la isoniazida mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Eficiencia de detección (inclusividad)

La eficiencia de detección de las especies de micobacterias incluidas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* del producto MDR/MTB ELITe MGB® se evaluó mediante un análisis *in silico* de las secuencias disponibles en la base de datos EBI ENA.

Las regiones seleccionadas para la hibridación de los primers y las sondas fluorescentes se verificaron con respecto a la alineación de las secuencias de las dianas MTB (IS6110), rpoB, katG e inhA. Las regiones de hibridación demostraron la conservación de la secuencia y la ausencia de mutaciones significativas en *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*.

La eficiencia de la detección de la especie de micobacterias presente en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* se verificó además mediante el análisis de un panel de ADN genómico certificado de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*.

Las muestras de ADN extraído se diluyeron y se analizaron en asociación con el sistema ELITe InGenius en modo «PCR Only».

Todos los aislados sometidos fueron detectados como positivos al MTB por el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Potenciales marcadores interferentes

La potencial reactividad cruzada con otras dianas del producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit se ha evaluado mediante un análisis *in silico* de las secuencias disponibles en la base de datos EBI ENA.

Las regiones seleccionadas para la hibridación de los primers y las sondas fluorescentes se verificaron con respecto a la alineación de secuencias en procariotas, incluyendo micobacterias no tuberculosas (NTM) y otros organismos que podrían estar presentes en las muestras clínicas. Las regiones de hibridación demostraron ausencia de homologías significativas y no indicaron potenciales interferencias.

La ausencia de reactividad cruzada con NTM también se verificó analizando un panel de ADN genómico certificado de *M. avium*, *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*. Asimismo, se probó un panel de ADN genómico certificado de otros organismos potencialmente presentes en las muestras de esputo: *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

Las muestras de ADN extraído se analizaron en asociación con el sistema ELITe InGenius en modo «PCR Only».

Todos los aislados analizados mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit resultaron negativos al MTBs.

Sustancias interferentes

Un panel de sustancias potencialmente interferentes a las concentraciones relevantes más altas de probó con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. Las sustancias probadas fueron antibióticos (rifampicina e isoniazida) y componentes del esputo (mucina, sangre humana entera).

A cada sustancia se añadieron muestras de esputo negativas al MTB positizadas con el material de referencia *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración de aproximadamente 2500 CFU/ml.

Las muestras se probaron en 3 réplicas con el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Sustancia	Concentración	Resultados corregidos
Rifampicina	25 µg/ml	3/3
Isoniazida	50 µg/ml	3/3
Mucina porcina	2% m/v (20 mg/ml)	3/3
Sangre entera en EDTA	5% v/v	3/3

Ninguna de las sustancias probadas a sus concentraciones relevantes más altas resultó interferir con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit junto con el sistema ELITe InGenius se ha verificado analizando las muestras positivas al MTB y las muestras negativas al MTB.

Una muestra de esputo negativa al MTB, positizada con material de referencia *Mycobacterium tuberculosis* a la concentración de aproximadamente 2500 CFU/ml, y una muestra de esputo negativa al MTB fueron analizadas en tres réplicas en dos ejecuciones por día con el mismo lote de producto (repetibilidad entre ejecuciones). Tres lotes distintos de producto fueron analizados en tres días distintos (repetibilidad entre lotes) con el mismo equipo y por el mismo operador.

Las muestras se procesaron en el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los valores Ct del complejo MTB diana (IS6110) y del control interno diana (IC2), así como los valores Tm de todos los patógenos diana (IS6110, rpoB, katG e inhA) se usaron para calcular el porcentaje del coeficiente de variabilidad (%CV) y evaluar así la repetibilidad en términos de imprecisión.

A continuación se muestra un resumen de los resultados.

Diana	Repetibilidad entre ejecuciones		Repetibilidad entre lotes	
	Ct medio	%CV Ct	Ct medio	%CV Ct
MTB	30,29	0,92	30,43	1,09
IC	29,11	1,91	29,89	2,54
Diana	Tm medio	%CV Tm	Tm medio	%CV Tm
MTB	68,3	0,08	68,4	0,11
rpoB1	67,0	0,12	67,0	0,20
rpoB2	71,4	0,11	71,5	0,15
rpoB3	69,9	0,37	70,0	0,26
rpoB4	66,3	0,71	66,4	0,53
katG	70,8	0,08	70,8	0,13
inhA	67,7	0,24	67,0	0,20

La repetibilidad del producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit para cada diana demostró un %CV que no superó el 3%.

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit junto con el sistema ELITe InGenius se ha verificado analizando las muestras positivas al MTB y las muestras negativas al MTB.

Una muestra de esputo negativa al MTB, positizada con material de referencia *Mycobacterium tuberculosis* a la concentración de aproximadamente 2500 CFU/ml, y una muestra de esputo negativa al MTB fueron analizadas en tres réplicas en dos ejecuciones por día. Tres lotes distintos de producto fueron probados en tres días distintos, en tres equipos distintos y por tres operadores distintos.

Las muestras se procesaron en el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los valores Ct del complejo MTB diana (IS6110) y del control interno diana (IC2), así como los valores Tm de todos los patógenos diana (IS6110, rpoB, katG e inhA) se usaron para calcular el porcentaje del coeficiente de variabilidad (%CV) y evaluar así la reproducibilidad en términos de imprecisión.

A continuación se muestra un resumen de los resultados.

Reproducibilidad		
Diana	Ct medio	%CV Ct
MTB	30,71	1,04
IC	30,88	2,39
Diana	Tm medio	%CV Tm
MTB	68,4	0,23
rpoB1	66,9	0,19
rpoB2	71,5	0,21
rpoB3	70,0	0,30
rpoB4	66,4	0,51
katG	70,9	0,16
inhA	67,2	0,61

La reproducibilidad del producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit para cada diana demostró un %CV que no superó el 3%.

Esputo: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 50 muestras clínicas de esputo positiva al MTB sometida a prueba mediante cultivo.

La especificidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 50 muestras clínicas de esputo negativas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Las muestras de esputo fueron recolectadas, pretratadas (según se describe en la sección «Muestras y controles»), cultivadas y certificadas como positivas al MTB o negativas al MTB por un laboratorio externo. Las muestras se inactivaron entonces y se probaron mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extraction + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

		Cultivo		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	50	1	51
	Neg.	0	47	47
	Total	50	48	98

Todas las muestras positivas al MTB resultaron positivas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la sensibilidad diagnóstica del ensayo es del 100%.

Entre las muestras negativas al MTB, dos muestras resultaron no válidas y fueron descartadas del análisis. De las 48 muestras válidas, 47 resultaron negativas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. El resultado positivo incoherente se confirmó como positivo al volver a someter a prueba la muestra de esputo. En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo es del 98%.

Además, las mismas muestras positivas al MTB y negativas al MTB fueron probadas también mediante otro ensayo diagnóstico molecular CE-IVD y mediante microscopio con tinción de AFB.

MDR/MTB ELITe MGB® Kit

reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS120ING

Las muestras clínicas analizadas mediante otro ensayo diagnóstico molecular CE-IVD resultaron 50 ser positivas al MTB y 50 negativas al MTB, al igual que cuando se probaron mediante cultivo. En la siguiente tabla se resume la comparación de los resultados con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

		Ensayo MDx CE-IVD		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	50	1	51
	Neg.	0	47	47
	Total	50	48	98

Todas las muestras positivas al MTB resultaron positivas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la sensibilidad diagnóstica del ensayo es del 100%.

Entre las muestras negativas al MTB, dos muestras resultaron no válidas y fueron descartadas del análisis. De las 48 muestras válidas, 47 resultaron negativas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. El resultado positivo incoherente se confirmó como positivo al volver a someter a prueba la muestra de esputo. En estas pruebas, la especificidad diagnóstica del ensayo es del 98%.

Las muestras clínicas probadas mediante microscopio con tinción de AFB resultaron ser 44 positivas al MTB y 56 negativas al MTB. En la siguiente tabla se resume la comparación de los resultados con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

		Microscopio con tinción AFB		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	44	7	51
	Neg.	0	47	47
	Total	44	54	98

Todas las muestras positivas al MTB resultaron positivas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Entre las muestras negativas al MTB, dos muestras resultaron no válidas y fueron descartadas del análisis. De las 54 muestras válidas, 47 resultaron negativas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. Seis de siete muestras incoherentes se confirmaron como positivas mediante otros dos métodos de referencia (cultivo y ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD). El último resultado incoherente se confirmó como positivo volviendo a probar la muestra de esputo sola con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Esputo: Confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

- 20 muestras clínicas de esputo positividadadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB),
- 20 muestras clínicas de esputo positividadadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG),
- 20 muestras clínicas de esputo positividadadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA),

Las muestras clínicas de esputo negativas al MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

MDR/MTB ELITe MGB® Kit

reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS120ING

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	Positivas al MTB	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	20	20	0	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	20	0	17	0	3
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	20	0	0	18	2

Todas las muestras resultaron positivas al MTB

Todas las muestras positividadadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la rifampicina.

Diecisiete de 20 muestras a las que se añadió un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación en el gen katG) se tipificaron correctamente como posiblemente resistentes a la isoniazida. No fue posible tipificar 3 muestras debido a la baja señal de MTB y por tanto se descartaron del análisis.

Dieciocho de 20 muestras positividadadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación en el gen inhA) se tipificaron correctamente como posiblemente resistentes a la isoniazida. No fue posible tipificar 2 muestras debido a la baja señal de MTB y por tanto se descartaron del análisis.

En estas pruebas, la sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

Esputo: Confirmación de las muestras positivas al MTB sensibles al antibiótico

La especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de 50 muestras clínicas de esputo positivo para determinar el MTB sensible al antibiótico.

Las muestras de esputo fueron recolectadas, pretratadas (según se describe en la sección «Muestras y controles»), cultivadas y certificadas como positivas al MTB y sensibles a la rifampicina y a la isoniazida por un laboratorio externo mediante una prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Las muestras se inactivaron entonces y se probaron mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extraction + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	Positivas al MTB	Resistencia RIF negativa + Resistencia INH negativa	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, sensibles a los antibióticos	50	47	3

Todas las muestras resultaron ser positivas al MTB, y 47 de 50 se tipificaron correctamente como posiblemente sensibles a la rifampicina y a la isoniazida. No fue posible tipificar 3 muestras debido a la baja señal de MTB y por tanto se descartaron del análisis.

En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

LBA/AB: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 6 muestras clínicas de LBA/AB positivas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo y 40 muestras clínicas de LBA/AB positividadadas.

La especificidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 40 muestras clínicas de LBA/AB negativas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Las muestras de LBA/AB fueron recolectadas, pretratadas (según se describe en la sección «Muestras y controles»), cultivadas y certificadas como positivas al MTB o negativas al MTB por un laboratorio externo. A las muestras positividadadas se les añadieron aislados de MTB sensibles a los antibióticos a la concentración final de aproximadamente 20 CFU/ml. Las muestras se inactivaron entonces y se probaron mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extraction + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

		Cultivo		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	42	1	43
	Neg.	4	39	43
	Total	46	40	86

Entre las muestras positivas al MTB o positividad, 42 de 46 muestras resultaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la sensibilidad diagnóstica del ensayo es del 91,3%.

Entre las muestras negativas al MTB, 39 de 40 muestras resultaron negativas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo es del 97,5%.

LBA/AB: Confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

- 2 muestras clínicas de LBA/AB positivas al MTB probadas mediante cultivo y resistentes a la rifampicina y a la isoniazida
- 40 muestras clínicas de LBA/AB positividad con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB),
- 40 muestras clínicas de LBA/AB positividad con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG),
- 40 muestras clínicas de LBA/AB positividad con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA),

Las muestras clínicas de LBA/AB negativas al MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina y a la isoniazida	2	0	0	0	2
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	40	40	0	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	40	0	40	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	40	0	0	39	1

Todas las muestras positividad con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la rifampicina.

Todas las muestras positividad con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida.

Todas las muestras positividad con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida. No fue posible tipificar 1 muestra debido a la baja señal de MTB y por tanto se descartaron del análisis.

En estas pruebas, la sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

LBA/AB: Confirmación de ausencia de mutación en muestras positivas al MTB

La especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de 80 muestras clínicas de LBA/AB positividad con un aislado de MTB portador de una mutación pero negativas para los otros dos.

Las muestras clínicas de LBA/AB negativas al MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	40	0	40	40	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	40	40	0	40	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	40	39	39	0	1

Todas las muestras positividad con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes katG e inhA.

Todas las muestras positividad con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB e inhA.

Todas las muestras positividad con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB y katG. No fue posible tipificar 1 muestra debido a la baja señal de MTB y por tanto se descartaron del análisis.

En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

Orina: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 12 muestras clínicas de orina positivas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo y 8 muestras clínicas de orina positividad.

La especificidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 20 muestras clínicas de orina negativas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Las muestras de orina fueron recolectadas, pretratadas (según se describe en la sección «Muestras y controles»), cultivadas y certificadas como positivas al MTB o negativas al MTB por un laboratorio externo. A las muestras positividad se les añadieron aislados de MTB sensibles a los antibióticos a la concentración final de aproximadamente 20 CFU/ml. Las muestras se inactivaron entonces y se probaron mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extraction + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

		Cultivo		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	16	0	16
	Neg.	4	20	24
	Total	20	20	40

Entre las muestras positivas al MTB o positividad, 16 de 20 muestras resultaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la sensibilidad diagnóstica del ensayo es del 80%.

Entre las muestras negativas al MTB, todas las muestras resultaron negativas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo es del 100%.

Orina: Confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

- 20 muestras clínicas de orina positizadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB),
- 20 muestras clínicas de orina positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG),
- 20 muestras clínicas de orina positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA),

Las muestras clínicas de orina negativas al MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	20	20	0	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	20	0	20	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	20	0	0	20	0

Todas las muestras positizadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la rifampicina.

Todas las muestras positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida.

Todas las muestras positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida.

En estas pruebas, la sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

Orina: Confirmación de ausencia de mutación en muestras positivas al MTB

La especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de 40 muestras clínicas de orina positizadas con un aislado de MTB portador de una mutación pero negativas para los otros dos.

Las muestras clínicas de orina negativas al MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	20	0	20	20	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	20	20	0	20	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	20	20	20	0	0

Todas las muestras positizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes katG e inhA.

Todas las muestras positizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB e inhA.

Todas las muestras positizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB y katG.

En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

Biopsias: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 22 muestras clínicas de biopsias positivas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo y 20 muestras clínicas de biopsias positizadas.

La especificidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 40 muestras clínicas de biopsias negativas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Las muestras de biopsias fueron recolectadas, pretratadas (según se describe en la sección «Muestras y controles»), cultivadas y certificadas como positivas al MTB o negativas al MTB por un laboratorio externo. A las muestras positizadas se les añadieron aislados de MTB sensibles a los antibióticos a la concentración final de aproximadamente 20 CFU/ml. Las muestras se inactivaron entonces y se probaron mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extraction + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

		Cultivo		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	38	0	38
	Neg.	4	40	44
	Total	42	40	82

Entre las muestras positivas al MTB o positizadas, 38 de 42 muestras resultaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la sensibilidad diagnóstica del ensayo es del 90,5%.

Entre las muestras negativas al MTB, todas las muestras resultaron negativas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo es del 100%.

Biopsias: Confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

- 40 muestras clínicas de biopsias positizadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB),
- 40 muestras clínicas de biopsias positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG),
- 40 muestras clínicas de biopsias positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA),

Las muestras clínicas de biopsias negativas al MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	40	40	0	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	40	0	40	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	40	0	0	40	0

Todas las muestras positizadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la rifampicina.

Todas las muestras positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida.

Todas las muestras positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida.

En estas pruebas, la sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

Biopsias: Confirmación de ausencia de mutación en muestras positivas al MTB

La especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de 80 muestras clínicas de biopsias positizadas con un aislado de MTB portador de una mutación pero negativas para los otros dos.

Las muestras clínicas de biopsias negativas al MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	40	0	40	40	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	40	40	0	40	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	40	40	40	0	0

Todas las muestras positizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes katG e inhA.

Todas las muestras positizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB e inhA.

Todas las muestras positizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB y katG.

En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

Fluidos serosos: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 20 muestras clínicas de fluidos serosos positivas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo y 20 muestras clínicas de fluidos serosos positizadas.

La especificidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 40 muestras clínicas de fluidos serosos negativas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Las muestras de fluidos serosos fueron recolectadas, pretratadas (según se describe en la sección «Muestras y controles»), cultivadas y certificadas como positivas al MTB o negativas al MTB por un laboratorio externo. A las muestras positizadas se les añadieron aislados de MTB sensibles a los antibióticos a la concentración final de aproximadamente 20 CFU/ml. Las muestras se inactivaron entonces y se probaron mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extraction + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

		Cultivo		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	39	0	39
	Neg.	1	40	41
	Total	40	40	80

Entre las muestras positivas al MTB o positizadas, 39 de 40 muestras resultaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la sensibilidad diagnóstica del ensayo es del 97,5%.

Entre las muestras negativas al MTB, todas las muestras resultaron negativas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo es del 100%.

Fluidos serosos: Confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

- 40 muestras clínicas de fluidos serosos positizadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB),
- 40 muestras clínicas de fluidos serosos positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG),
- 40 muestras clínicas de fluidos serosos positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA),

Las muestras clínicas de fluidos serosos negativas al MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	40	40	0	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	40	0	40	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	40	0	0	40	0

Todas las muestras positizadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la rifampicina.

Todas las muestras positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida.

Todas las muestras positizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida.

En estas pruebas, la sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

Fluidos serosos: Confirmación de ausencia de mutación en muestras positivas al MTB

La especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de 80 muestras clínicas de fluidos serosos positizadas con un aislado de MTB portador de una mutación pero negativas para los otros dos.

Las muestras clínicas de fluidos serosos negativas al MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITe InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	40	0	40	40	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	40	40	0	40	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	40	40	40	0	0

Todas las muestras positivizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes katG e inhA.

Todas las muestras positivizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB e inhA.

Todas las muestras positivizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB y katG.

En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100 %.

Aspirados gástricos: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 22 muestras clínicas de aspirados gástricos positivas al MTB sometido a prueba mediante cultivo.

La especificidad diagnóstica del ensayo, en términos de confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 20 muestras clínicas de aspirados gástricos negativas al MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Las muestras de aspirados gástricos fueron recolectadas, pretratadas (según se describe en la sección «Muestras y controles»), cultivadas y certificadas como positivas al MTB o negativas al MTB por un laboratorio externo. Las muestras se inactivaron entonces y se probaron mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo «Extraction + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

		Cultivo		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	18	0	18
	Neg.	4	20	24
	Total	22	20	42

Entre las muestras positivas al MTB o positivizadas, 18 de 22 muestras resultaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la sensibilidad diagnóstica del ensayo es del 81,8%.

Entre las muestras negativas al MTB, todas las muestras resultaron negativas con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo es del 100%.

Aspirados gástricos: Confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

- 20 muestras clínicas de aspirados gástricos positivizadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB),
- 20 muestras clínicas de aspirados gástricos positivizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG),
- 20 muestras clínicas de aspirados gástricos positivizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA),

Las muestras clínicas de aspirados gástricos negativas al MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	20	20	0	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	20	0	20	0	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	20	0	0	20	0

Todas las muestras positivizadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen rpoB) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la rifampicina.

Todas las muestras positivizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen katG) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida.

Todas las muestras positivizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen inhA) fueron correctamente tipificadas como posiblemente resistentes a la isoniazida.

En estas pruebas, la sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

Aspirados gástricos: Confirmación de ausencia de mutación en muestras positivas al MTB

La especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico, como confirmación de las muestras positivas al MTB resistentes al antibiótico, se evaluó mediante el análisis de 40 muestras clínicas de aspirados gástricos positivizadas con un aislado de MTB portador de una mutación pero negativas para los otros dos.

Las muestras clínicas de aspirados gástricos negativas al MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 CFU/ml con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo en cuanto a las mutaciones en uno de los tres genes diana, mediante un ensayo de diagnóstico molecular con marca CE-IVD. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	MTB positivo	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificado no factible
Muestras positivas al MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	20	0	20	20	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	20	20	0	20	0
Muestras positivas al MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	20	20	20	0	0

Todas las muestras positivizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes katG e inhA.

Todas las muestras positivizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB e inhA.

Todas las muestras positivizadas con un aislado MTB con una mutación del gen rpoB se tipificaron correctamente como no mutadas para los genes rpoB y katG.

En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia al antibiótico es del 100%.

Nota importante: Los datos y resultados completos de las pruebas realizadas para la evaluación de las características de las prestaciones del producto con las matrices y el equipo se recogen en la documentación técnica del producto «MDR/MTB ELITe MGB Kit», FTP 120ING.

BIBLIOGRAFÍA

- Thierry D. et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 188
 Heep M. et al. (2001) JCM 39: 107 – 110
 Seifert M. et al. (2015) PLOS ONE DOI 10.1371: 1 - 13
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30
 Mycobacteriology laboratory manual (Global Laboratory Initiative, First edition, April 2014).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilice este producto solo con muestras clínicas de esputo, lavados broncoalveolares (LBA), aspirados bronquiales (AB), orina, fluidos serosos, biopsias y aspirados gástricos fluidificados, descontaminadas e inactivadas.

No utilizar con este producto muestras que contengan mucina a concentraciones de más del 2%: la mucina inhibe la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos y da lugar a resultados no válidos.

De momento no hay datos disponibles acerca de las prestaciones de este producto con las siguientes muestras clínicas: líquido cefalorraquídeo (LCF), materiales necróticos-purulentos, heces, sangre.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de la correcta identificación, recogida, transporte, conservación y procesamiento de las muestras. Por tanto, para evitar resultados incorrectos, es necesario prestar especial atención durante estos pasos y seguir las instrucciones facilitadas con los productos para la extracción de los ácidos nucleicos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, la metodología de amplificación en tiempo real utilizada en este producto está sujeta a contaminación cruzada con las muestras positivas, los controles positivos y los productos mismos de la amplificación. Las contaminaciones cruzadas dan lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto puede limitar las contaminaciones cruzadas. Sin embargo, las contaminaciones cruzadas pueden evitarse únicamente mediante la buena práctica de las técnicas de laboratorio y siguiendo atentamente las instrucciones de uso.

Para utilizar este producto se requiere personal cualificado y con la formación necesaria para el procesamiento de muestras biológicas que pueden transmitir agentes infecciosos, así como de preparados químicos clasificados como peligrosos, para evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas.

Con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, para utilizar este producto, las áreas de trabajo y la ropa de trabajo deben ser adecuadas para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas, así como productos químicos clasificados como peligrosos.

Este producto requiere el uso de ropa de trabajo e instrumentos adecuados para la configuración de la sesión de trabajo, para evitar resultados incorrectos.

Debido a las diferencias inherentes que existen entre las distintas tecnologías, se recomienda a los usuarios realizar estudios de correlación de métodos para evaluar dichas diferencias antes de pasar a una nueva tecnología.

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que el ADN diana no se ha detectado en el ADN extraído a partir de la muestra. No se puede descartar que el ADN diana tenga un título inferior frente al límite de detección del producto (ver las Características de las prestaciones). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

Los resultados obtenidos con este producto a veces pueden ser no válidos debido a un fallo del control interno. En este caso la muestra debe volver a analizarse, a partir de la extracción, lo que puede conllevar retrasos en la obtención de los resultados finales.

Los resultados obtenidos con este producto en cuanto a la posible resistencia a la rifampicina y/o a la isoniazida del MTB se limitan a la detección de mutaciones principales, tal y como se describe en la sección «Principio del ensayo». Otras mutaciones no detectadas por este producto pueden estar asociadas a la resistencia a la rifampicina y/o a la isoniazida. Por otra parte, este producto puede detectar mutaciones silenciosas, si bien estas no estén asociadas a la resistencia a la rifampicina y/o a la isoniazida. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana fenotípica se requiere por tanto para confirmar la susceptibilidad del MTB a la rifampicina y/o a la isoniazida.

Posibles polimorfismos en la región del ADN diana cubierto por los primers y las sondas del producto podrían perjudicar la detección del ADN diana.

Como para cualquier otro equipo médico de diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y los demás exámenes de laboratorio correspondientes al paciente.

Como para cualquier otro producto sanitario de diagnóstico, existe un riesgo residual de que con este producto se consigan resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos. Este riesgo residual no se puede eliminar ni reducir aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Reacción no válida del control positivo	
Posibles causas	Soluciones
Error de la configuración de la ejecución.	Revisar la posición de la mezcla PCR Mix y del control positivo. Revisar los volúmenes de la mezcla PCR Mix y del control positivo.
Degradación del control positivo.	Usar una nueva porción de control positivo.
Degradación de la mezcla de PCR.	Usar nuevas alícuotas de las mezclas de PCR.
Error del equipo.	Contactar con la asistencia técnica de ELITechGroup.

Reacción no válida del control negativo	
Posibles causas	Soluciones
Error de la configuración de la ejecución.	Revisar la posición de la mezcla PCR Mix y del control negativo. Revisar los volúmenes de la mezcla PCR Mix y del control negativo.
Contaminación del control negativo	Usar una nueva alícuota de agua de grado molecular para biología.
Contaminación de la mezcla de PCR.	Use nuevas alícuotas de las mezclas de PCR.
Contaminación del área de extracción, de los «racks» o de los «inventory blocks».	Limpiar las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas, reemplazar las probetas y las puntas utilizadas.
Error del equipo.	Contactar con la asistencia técnica de ELITechGroup.

Reacción de la muestra no válida	
Resultados no definidos / tipificado no factible / tipificado no válido	
Posibles causas	Soluciones
Error de la configuración de la ejecución.	Revisar la posición de la mezcla PCR Mix y de la muestra. Revisar los volúmenes de la mezcla PCR Mix y de la muestra.
Degradación del control interno.	Usar nuevas porciones del control interno.
Inhibición debido a sustancias interferentes con las muestras.	Repetir la amplificación con una dilución de 1:3 en agua de grado molecular para biología de la muestra extraída en una ejecución en el modo «PCR only». Repetir la extracción y la amplificación de la muestra con una dilución de 1:2 en agua de grado molecular para biología de la muestra primaria en una ejecución en modo «Extract + PCR».
Degradación de la mezcla de PCR.	Usar nuevas alícuotas de las mezclas de PCR.
Error del equipo.	Contactar con la asistencia técnica de ELITechGroup.

Error 30103	
Posibles causas	Soluciones
Concentración demasiado alta de la diana en la muestra.	Si se observa una amplificación notable en el gráfico de PCR: - seleccionar el track de la muestra y aprobar manualmente el resultado. Si se requiere un valor Ct: - repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua de grado molecular para biología de la muestra extraída en una ejecución en modo «PCR only» o - repetir la extracción con una dilución de 1:10 en agua de grado molecular para biología de la muestra primaria extraída en una ejecución en el modo «Extract + PCR».

SÍMBOLOS

REF

Número de catálogo.



Límite superior de temperatura.

LOT

Código del lote.

IVD

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Utilizar antes de (último día del mes).



Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.



Contenido suficiente para «N» pruebas.



Atención: Consúltense las instrucciones de uso.

CONT

Contenido.



Proteger de la luz solar.



Fabricante.

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Este producto contiene reactivos fabricados por Life Technologies Corporation y se venden bajo acuerdos de licencia entre ELITechGroup S.p.A. y sus filiales y Life Technologies Corporation. El precio de compra de este producto incluye derechos limitados e intransferibles para utilizar únicamente esta cantidad del producto para actividades del comprador que estén directamente relacionadas con el diagnóstico humano. Para obtener información sobre la compra de una licencia de este producto para fines distintos de los indicados anteriormente, póngase en contacto con el Departamento de Licencias, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Teléfono: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Correo electrónico: outlicensing@thermofisher.com.

Los reactivos de detección ELITe® MGB están cubiertos por uno o más de los EE.UU. Números de patente 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7, 319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8, 067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 y las patentes EP números 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939, así como las solicitudes que están actualmente en trámite.

Esta licencia limitada permite a la persona o entidad legal a la que se ha proporcionado este producto utilizarlo, y los datos generados por el uso del producto, sólo para el diagnóstico humano. Ni ELITechGroup S.p.A. ni sus licenciarios conceden ninguna otra licencia, expresa o implícita, para ningún otro propósito.

MDR/MTB ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Ref: RTS120ING



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «MDR/MTB ELITE MGB® Kit» is part of a qualitative nucleic acid amplification assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*) DNA and to identify the main mutations associated with resistance to Rifampicin and/or Isoniazid.

The product may be used for two different purposes:

- as an aid in the diagnosis of tuberculosis from *Mycobacterium tuberculosis* complex, in association with the patient's clinical data and other laboratory test results, in particular the culture methods for mycobacterium,
- as an aid in the diagnosis of tuberculosis and genotypic resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex, in association with the patient's clinical data and other laboratory test results, in particular phenotypic testing for antimicrobial susceptibility.

The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

Mix	Target	Gene	Fluorophore
TB1	MTB Complex	IS6110	FAM
	Rifampicin resistance	rpoB gene (rpoB2, rpoB3, rpoB4)	AP639; AP525; AP593
TB2	Rifampicin resistance	rpoB gene (rpoB1)	AP639
	Isoniazid resistance	katG	FAM
		inhA	AP593
TB1/TB2	Internal Control	Artificial sequence	AP680

C. Validated matrix

- › Sputum, bronchial aspirates (BA), bronchoalveolar lavages (BAL), urine, biopsies, cavity fluids and gastric aspirates previously liquefied, decontaminated and inactivated.

D. Kit content

TB1 PCR Mix	TB2 PCR Mix
Ready-to-use PCR Master Mix 4 tubes of 280 µL 7 freeze-thaw cycles per tube	Ready-to-use PCR master Mix 4 tubes of 280 µL 7 freeze-thaw cycles per tube
	
› 48 reactions per kit	› Storage Temperature: -20°C
	› Maximum shelf-life: 24 months

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|--|--|
| › ELITE InGenius instrument: INT030 | › MDR/MTB- ELITE Positive Control : CTR120ING |
| › ELITE InGenius SP 200 extraction cartridges: INT032SP200 | › CPE- Internal Control : CTCPE |
| › ELITE InGenius PCR Cassette amplification cartridges: INT035PCR | › ELITE InGenius Waste Box : F2102-000 |
| › ELITE InGenius SP 200 Consumable Set consumables for extraction: INT032CS | › 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S |

F. ELITE InGenius protocol

- | | | | |
|--|--------|------------------------------|---------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of qualitative result | CFU/mL |
| › Internal Control volume | 10 µL | | |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › PCR eluate input volume for each mix | 20 µL | | |
| › Q-PCR Mix volume for each mix | 20 µL | | |

G. Performance

Sample	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MTB Complex	Sputum	6 CFU/mL	100% 50/50*	98% 47/48*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Sputum	-	100% 55/55*	100% 47/47*
MTB Complex	BAL/BA	6 CFU/mL	91.3% 42/46*	97.5% 39/40*
Rifampicin and Isoniazid resistance	BAL/BA	-	100% 119/119*	100% 119/119*
MTB Complex	Urine	20 CFU/mL	80% 16/20*	100% 20/20*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Urine	-	100% 60/60*	100% 60/60*
MTB Complex	Biopsy	20 CFU/mL	90.5% 38/42*	100% 40/40*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Biopsy	-	100% 120/120*	100% 120/120*
MTB Complex	Cavitary Liquid	20 CFU/mL	97.5% 39/40*	100% 40/40*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Cavitary Liquid	-	100% 120/120*	100% 120/120*
MTB Complex	Gastric aspirates	20 CFU/mL	81.8% 18/22*	100% 20/20*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Gastric aspirates	-	100% 60/60*	100% 60/60*

*confirmed samples/ tested samples

H. Procedures

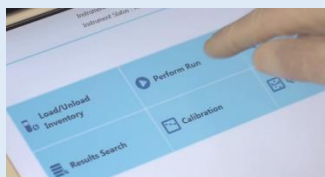
The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

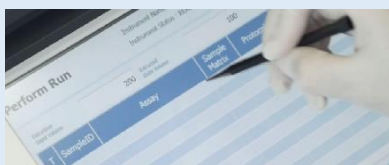
1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify controls: TB pos. and neg. controls in the "Control menu" NB: Both have been run, approved and not expired	3. Thaw TB1 and TB2 PCR Mixes and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
---	--	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen



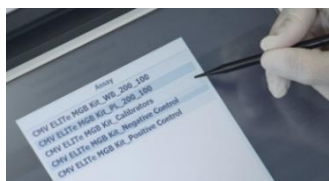
2. Verify the extraction volumes:
Input: "200 µL", eluate: "100 µL"



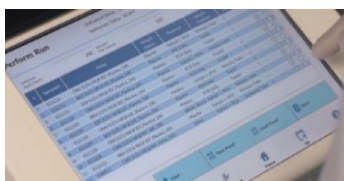
3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID



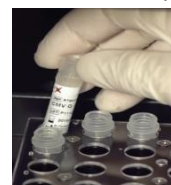
4. Select the "Assay protocol" of interest



5. Select the sample position:
"Extraction tube"



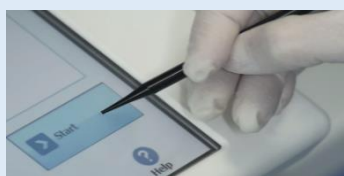
6. Load the PCR Mixes and the Internal Control in the inventory block



7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, Extraction tube racks



8. Close the door
Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

- 1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"

6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4

7. Load the PCR cassette rack
Load the PCR Mixes in the inventory block

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

- 1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Extraction tube

6. Load the Internal Control in the inventory block

7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction tube racks

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

**confirmed samples/ tested samples*