

NOTICE of CHANGE dated 01/09/2025

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:

- *Additional testing on negative sputum samples*
- *Verification of effectiveness in detecting new mutations identified in the *rpoB* and *katG* genes, associated respectively with resistance to Rifampicin and Isoniazid, in *Mycobacterium tuberculosis* samples.*
- *The messages for the results of the MTB complex detection and the analysis of MTB antibiotic resistance were aligned to the outputs of the current version of the assay protocol.*

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



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Turin (ITALIA)

Sede: Tel.: +39-011 976 191 - Fax: +39-011 936 76 11

Correo electrónico:
emd.support@elitechgroup.com

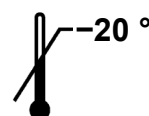
MDR/MTB ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS120ING



IVD



ÍNDICE

USO PREVISTO	página 1
PRINCIPIOS DEL ENSAYO	página 2
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO	página 2
MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO	página 3
MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO	página 3
OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS	página 3
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	página 4
MUESTRAS Y CONTROLES	página 5
PROCEDIMIENTO	página 7
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	página 15
BIBLIOGRAFÍA	página 28
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	página 30
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	página 31
SÍMBOLOS	página 32
NOTA PARA LOS USUARIOS	página 33
AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA	página 33

USO PREVISTO

El producto **MDR/MTB ELITE MGB® Kit** forma parte de un ensayo cualitativo de amplificación de ácidos nucleicos que se utiliza para detectar ADN del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*), así como para identificar las principales mutaciones que se asocian a la resistencia a la rifampicina o a la isoniazida.

El ensayo debe llevarse a cabo con el instrumento **ELITE InGenius®**, a partir de muestras de esputo, aspirados bronquiales (AB), lavados broncoalveolares (LBA), orina, líquidos cavitarios, 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.

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 para las operaciones de extracción, amplificación y detección, así como para la 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 Internal Control exógeno se amplifica en las mezclas TB1 PCR Mix y TB2 PCR Mix. El Internal Control 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 instrumento 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 instrumento **ELITE InGenius**, a partir de muestras de esputo, lavados broncoalveolares (LBA), aspirados bronquiales (AB), orina, líquidos cavitarios, biopsias y aspirados gástricos tras haber sido licuadas descontaminadas e inactivadas.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto **MDR/MTB ELITE MGB® Kit** incluye dos mezclas completas listas para el uso para la amplificación en tiempo real, a saber, las mezclas TB1 PCR Mix y TB2 PCR Mix, **cada una de ellas distribuida 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 cebadores 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** del Internal Control. 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 cebadores 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,

MDR/MTB ELITE MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real****REF****RTS120ING**

- 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,
- 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** del Internal Control. 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 análisis cuando se utiliza el ELITE InGenius**, incluidos los controles.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de riesgos
TB1 PCR Mix	Mezcla completa de reacción Tapa ROJA	4 × 280 µL	-
TB2 PCR Mix	Mezcla completa de reacción Tapa BLANCA	4 × 280 µL	-

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitador vórtex.
- Microcentrifugadora de mesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).
- Agua para biología molecular.

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

Los reactivos para la extracción de ADN de las muestras que van a analizarse, el Internal Control de extracción e inhibición, el Positive Control de amplificación y los consumibles **no** están incluidos en este producto

Para la extracción automática de ADN, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados de las muestras, es necesario utilizar el instrumento **ELITE InGenius** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) y los siguientes Assay Protocols (protocolos de ensayo) específicos:

- parámetros para el Positive Control de amplificación **MDR-MTB ELITE_PC**,
- parámetros para el Negative Control 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 instrumento **ELITE InGenius**, es necesario utilizar 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).

Como plantilla de Internal Control de extracción e inhibición, es necesario utilizar el producto genérico **CPE - Internal Control** (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE). Se trata de una solución estabilizada que contiene ADN plasmídicos y ARN genómico del bacteriófago.

Como plantilla de Positive Control 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 está diseñado 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 conforme a las normas de seguridad aplicables. El material desechable combustible debe incinerarse. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de ser eliminados.

Utilizar ropa 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 proporcionadas con el producto.

Durante la realización del ensayo, seguir las instrucciones proporcionadas con el producto.

No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada.

Utilizar únicamente los reactivos incluidos en el volumen de suministro del 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

Con el fin de evitar el riesgo de resultados incorrectos, sobre todo debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o a la contaminación de estas con productos de amplificación, para los procedimientos de biología molecular se requiere personal debidamente formado y cualificado.

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

Las muestras deben ser aptas y, en la medida de lo posible, estar destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras inactivadas deben manipularse bajo una cabina de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Los cartuchos «PCR Cassette» deben manipularse evitando en lo posible la dispersión del producto de amplificación hacia el entorno para que no se produzca una contaminación de las muestras ni de los reactivos.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes:

Las **mezclas de PCR TB1 y TB2** se deben conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un lugar oscuro.

Las **mezclas de PCR TB1 y TB2** 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 utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Muestras de esputo

Las muestras de esputo para la extracción de ADN deben recopilarse e identificarse de acuerdo con las instrucciones de los laboratorios de micobacteriología, así como transportarse y conservarse a una temperatura comprendida entre $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 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 debe inactivarse a continuación a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, es necesario verter 0,2 mL de la muestra inactivada en el «**Extraction Tube**» (**tubo de extracción**) incluido en el volumen de suministro del producto **ELITE InGenius SP 200 Consumable Set**.

Las muestras de esputo licuadas y descontaminadas pueden congelarse y conservarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de un mes, o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante períodos más largos. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Nota: para llevar a cabo la extracción de ADN de las muestras de esputo con el instrumento **ELITE InGenius** y la versión **1.3** del **ELITE InGenius Software** (o cualquier versión posterior), es necesario utilizar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) **MDR MTB ELITE_SP_200_100**, que procesa 200 μL de muestra, añade el **CPE - Internal Control** a 10 μL /extracción y eluye 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 $+2/+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 debe inactivarse a continuación a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, es necesario verter 0,2 mL de la muestra inactivada en el «**Extraction Tube**» (**tubo de extracción**) incluido en el volumen de suministro del producto **ELITE InGenius SP 200 Consumable Set**.

Las muestras de LBA/AB licuadas y descontaminadas pueden congelarse y conservarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante máximo un mes, o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por períodos más prolongados. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Nota: para llevar a cabo la extracción de ADN de las muestras de LBA/AB con el instrumento **ELITE InGenius** y la versión **1.3** del **ELITE InGenius Software** (o cualquier versión posterior), es necesario utilizar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) **MDR MTB ELITE_BAL_200_100**, que procesa 200 μL de muestra, añade el **CPE - Internal Control** a 10 μL /extracción y eluye 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 $+2/+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, es necesario verter 0,2 mL de la muestra inactivada en el «**Extraction Tube**» (**tubo de extracción**) incluido en el volumen de suministro del producto **ELITE InGenius SP 200 Consumable Set**.

Las muestras de orina concentradas y descontaminadas pueden congelarse y conservarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante máximo un mes, o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por períodos más prolongados. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Nota: para llevar a cabo la extracción de ADN de las muestras de orina con el instrumento **ELITe InGenius** y la versión **1.3** del **ELITe InGenius Software** (o cualquier versión posterior), es necesario utilizar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) **MDR MTB ELITe_U_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Fluidos serosos

Las muestras de líquidos cavitarios para la extracción de ADN deben recogerse e identificarse según las directrices para laboratorios, así como transportarse y conservarse a una temperatura comprendida entre +2 ° y +8 °C durante dos días como máximo. 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, es necesario verter 0,2 mL de la muestra inactivada en el «**Extraction Tube**» (**tubo de extracción**) incluido en el volumen de suministro del producto **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**.

Las muestras de líquidos serosos concentradas y descontaminadas pueden congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de un mes, o a -70 °C durante períodos más largos. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Nota: para llevar a cabo la extracción de ADN de las muestras de líquidos cavitarios con el instrumento **ELITe InGenius** y la versión **1.3** del **ELITe InGenius Software** (o cualquier versión posterior), es necesario utilizar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) **MDR MTB ELITe_CL_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µL/extracción y eluye 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 descontaminelas 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, es necesario verter 0,2 mL de la muestra inactivada en el «**Extraction Tube**» (**tubo de extracción**) incluido en el volumen de suministro del producto **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 durante períodos más largos. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Nota: para llevar a cabo la extracción de ADN de las muestras de biopsia con el instrumento **ELITe InGenius** y la versión **1.3** del **ELITe InGenius Software** (o cualquier versión posterior), es necesario utilizar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) **MDR MTB ELITe_B_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µL/extracción y eluye 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 debe inactivarse a continuación a 95 °C durante 30 minutos. Para el análisis con este producto, es necesario verter 0,2 mL de la muestra inactivada en el «**Extraction Tube**» (**tubo de extracción**) incluido en el volumen de suministro del producto **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**.

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

Nota: para llevar a cabo la extracción de ADN de las muestras de aspirados gástricos con el instrumento **ELITe InGenius** y la versión **1.3** del **ELITe InGenius Software** (o cualquier versión posterior), es necesario utilizar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) **MDR MTB ELITe_GA_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el CPE - Internal Control a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Sustancias interferentes

Los datos disponibles relativos a la inhibición causada por medicamentos y otras sustancias se incluyen en la sección «Sustancias interferentes» del apartado «Características de rendimiento».

Controles de amplificación

Antes de analizar una muestra, es obligatorio preparar y aprobar los controles de amplificación correspondientes para el lote de reactivos de amplificación que va a utilizarse en el análisis:

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

Nota: el sistema **ELITe InGenius** necesita 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 **a los 15 días**. Al llegar la fecha de caducidad, es necesario volver a procesar el Positive Control y el Negative Control con el lote de reactivos de amplificación.

Además, los controles de amplificación también deben volver a procesarse en los siguientes casos:

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos de amplificación.
- Los resultados de los controles de calidad (consultar el apartado siguiente) se encuentran fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de mantenimiento en el instrumento **ELITe InGenius**.

Controles de calidad

Se recomienda validar periódicamente todo el procedimiento de 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:

- Verificación de la disponibilidad del sistema
- Configuración de la sesión.
- Revisión y aprobación de los resultados

Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes de iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento:

- Encender el instrumento **ELITe InGenius** y seleccionar el modo de inicio de sesión **«CLOSED»**.
- Comprobar que los controles de amplificación (controles, TB Positive Control y TB Negative Control) 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 cuenta con resultados aprobados y válidos de los controles de amplificación, habrá que generarlos como se indica en los siguientes apartados.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (protocolos de ensayo) proporcionados por ELITechGroup S.p.A. Estos protocolos IVD se han validado específicamente con los productos **ELITe MGB® kit**, el instrumento **ELITe InGenius** y la matriz indicada.

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

MDR/MTB ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF**RTS120ING**

Assay Protocol (Protocolo de ensayo) para el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit para la detección de la tuberculosis y la identificación de la resistencia genotípica del complejo MTB

Nombre	Matriz	Tasa de unidad	Características
MDR-MTB ELITe_SP_200_100	Espuito	Positivo / negativo / resistencia a positiva / resistencia a negativa	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_BAL_200_100	LBA/AB	Positivo / negativo / resistencia a positiva / resistencia a negativa	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_U_200_100	Orina	Positivo / negativo / resistencia a positiva / resistencia a negativa	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_CL_200_100	Fluidos serosos	Positivo / negativo / resistencia a positiva / resistencia a negativa	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_B_200_100	Biopsias	Positivo / negativo / resistencia a positiva / resistencia a negativa	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_GA_200_100	Aspirados gástricos	Positivo / negativo / resistencia a positiva / resistencia a negativa	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 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 Assay Protocol (protocolo de ensayo) deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELITechGroup más cercano.

Configuración de la sesión

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

- A. Sesión integrada: modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
- B. Sesión de amplificación: modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).
- C. Sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control: modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).

Todos los parámetros necesarios para la sesión están incluidos en el Assay Protocol (protocolo de ensayo) disponible en el instrumento y se abren automáticamente al seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo).

Nota: el instrumento **ELITE InGenius** puede conectarse al «servidor de información de laboratorios» (LIS, «Laboratory Information Server»), que permite enviar la información de la sesión de trabajo. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

A continuación, se describen los pasos principales para configurar los tres tipos de sesión.

A. Sesión integrada

Para configurar una sesión integrada con la extracción y amplificación de la muestra, seguir las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación:

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 con cuidado y, después, 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 fotosensibles.

2. Descongelar las probetas de CPE para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar delicadamente y centrifugar las probetas durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
4. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado en 200 µL, y «Extracted Elute Volume» (Volumen de eluido extraído), en 100 µL.
5. Para cada pista deseada, rellenar el ID de la muestra («SampleID» o SID) escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
6. En la columna «Assay» (Ensayo), seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) que se desea utilizar (por ejemplo, MDR-MTB ELITE_SP_200_100).
7. Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» (Protocolo) sea «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
8. En la columna «Sample Position» (Posición de la muestra), seleccionar la posición de carga de la muestra y elegir «Extraction Tube» (Tubo de extracción). Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
9. Cargar el CPE y las mezclas TB1 PCR Mix y TB2 PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
10. Cargar y revisar las puntas en el área de «Tip Racks» (Rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
11. Cargar los cartuchos de PCR, así como los cartuchos de extracción «ELITE InGenius SP 200», todos los consumibles necesarios y las muestras que deben extraerse, siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
12. Cerrar la puerta del instrumento.
13. Pulsar «Start» (Inicio) para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el instrumento **ELITE InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: Al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, así como taparse, identificarse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: Al finalizar la sesión, los cartuchos de PCR que contienen los productos de reacción y los consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar 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. Sesión de amplificación

Para configurar una sesión de amplificación a partir de los ácidos nucleicos extraídos, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

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 con cuidado y, después, 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 fotosensibles.

2. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
3. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.
4. Para cada carril deseado, rellenar el SID escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
5. En la columna «Assay» (Ensayo), seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) que se desea utilizar (por ejemplo: MDR-MTB ELITe_SP_200_100).
6. Seleccionar «PCR Only» (Solo PCR) en la columna «Protocol» (Protocolo).
7. Asegurarse de que la posición de carga de la muestra de la columna «Sample Position» (Position de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]) Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar las puntas en el área de «Tip Racks» (Rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» (Siguiente) 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 de usuario. Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
11. Cerrar la puerta del instrumento.
12. Pulsar «Start» (Inicio) para iniciar la sesión.

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

Nota: Al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, así como taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: Al finalizar la sesión, los cartuchos de PCR que contienen los productos de reacción y los consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar 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. Sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control

Para configurar la sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo 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 con cuidado y, después, 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 fotosensibles.

2. Descongelar la probeta de TB Positive Control para la sesión. Cada probeta es suficiente para 2 sesiones. Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 100 µL de agua para biología molecular en una «Elution Tube» (probeta de elución), incluida en el volumen de suministro del producto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
5. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.
6. En la pista deseada, seleccionar en la columna «Assay» (Ensayo) el protocolo de ensayo que va a utilizarse.
7. Para el Positive Control, en la columna «Assay» (Ensayo) seleccionar MDR-MTB ELITe_PC y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del TB Positive Control.
8. Para el Negative Control, en la columna «Assay» (Ensayo) seleccionar MDR-MTB ELITe_NC y rellenar introducir el número de lote y la fecha de caducidad del agua para biología molecular.
9. Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
10. Cargar la mezcla TB1 PCR Mix y la mezcla TB2 PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
11. Cargar y revisar las puntas en el área de «Tip Racks» (Rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
12. Cargar los cartuchos «PCR Cassettes», la probeta de TB Positive Control y la probeta de Negative Control siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del instrumento.
14. Pulsar «Start» (Inicio) para iniciar la sesión.

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

Nota: Al finalizar la sesión, el Positive Control que queda debe extraerse del instrumento, así como taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar el Positive Control. La parte que queda del Negative Control debe eliminarse.

Nota: Al finalizar la sesión, los cartuchos «PCR Cassette» que contienen los productos de reacción y los consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar 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 finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display», en la que se muestran los resultados de la muestra/de los controles y la información relativa a la sesión. En esta pantalla, es posible aprobar el resultado, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

Nota: El sistema **ELITe InGenius** puede conectarse al sistema de información de ubicaciones (LIS, «Location Information System»), que permite enviar los resultados de la sesión de trabajo al centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

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

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

- A. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación
- B. Validación de los resultados de las muestras.
- C. Generación del informe de resultados de la muestra

A. Validación de los resultados del Positive Control y Negative Control 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 Positive Control y del Negative Control son analizadas automáticamente e interpretadas por el software del instrumento con los parámetros incluidos en los Assay Protocols (protocolos de ensayo) «MDR-MTB ELITe_PC» y «MDR-MTB ELITe_NC».

Los resultados del Positive Control y del Negative Control de la amplificación, específicos para el lote de reactivos de amplificación utilizado, se guardan en la base de datos («Controls»). El personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede consultar dichos resultados y aprobarlos siguiendo las instrucciones de la interfaz.

Nota: El Positive Control y el Negative Control 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 Positive Control y del Negative Control, específicos para el lote de reactivo de amplificación, caducan **a los 15 días**.

El software del instrumento utiliza los resultados de los ciclos de amplificación del Positive Control y del Negative Control para configurar los gráficos de control («Control Charts»). Se requieren al menos cuatro resultados del Positive Control y del Negative Control de cuatro ciclos distintos. Después de esto, los resultados del Positive Control y del Negative Control se utilizan para controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

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

Nota: si el Positive Control o el Negative Control se procesan junto con las muestras que van a analizarse y el resultado no es válido, se invalida la sesión 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 Internal Control (IC) en las reacciones de amplificación de la muestra son analizadas automáticamente e interpretadas por el software del instrumento con los parámetros incluidos en los Assay Protocols (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 instrumento («Result Display»).

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

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

Para cada muestra, el sistema interpreta automáticamente el resultado del ensayo a partir de los valores Ct (para el complejo MTB y el Internal Control) y los valores Tm (para el MTB y el análisis de resistencia) según lo establecen el algoritmo del **ELITE InGenius Software** 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 detectado	Se ha detectado ADN del complejo MTB en la muestra en cantidad suficiente para poder realizar el análisis de resistencia a los antibióticos (véase la siguiente tabla).
MTB:DNA No detectado o por debajo del límite de detección	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 (No válido-Volver a probar muestra)	Resultado del ensayo no válido debido a problemas con el Internal Control (extracción incorrecta o presencia de inhibidores). Es necesario repetir la prueba.
Inconclusive – Retest Sample (No concluyente. Repetir prueba)	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 a los antibióticos de la muestra se indican en la siguiente tabla.

Resultado de una sesión de la muestra	Interpretación
RIF:RESISTANCE NEGATIVE (RIF:RESISTENCIA NEGATIVA)	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 (RIF: MUESTRAS CON RESISTENCIA POSITIVA)	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 (INH:RESISTENCIA NEGATIVA)	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 (INH: MUESTRAS CON RESISTENCIA POSITIVA)	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 (RIF:Tipificación no válida. Repetir muestra) INH:Typing Invalid - Retest Sample (INH:Tipificación no válida. Repetir muestra)	Resultado del ensayo no válido debido a problemas en el análisis de resistencia a los antibióticos. Es necesario repetir la prueba.

Cuando se detecta ADN del complejo MTB en la muestra y se realiza en análisis de resistencia a los antibióticos, los mensajes de los resultados pueden mostrarse en distintas combinaciones; por ejemplo, MTB DNA detected (ADN de MTB detectado), RIF: RESISTANCE NEGATIVE (RIF: RESISTENCIA NEGATIVA), INH RESISTANCE POSITIVE (INH: RESISTENCIA POSITIVA), katG, inhA

En ocasiones, una muestra positiva a título alto para ADN de MTB puede presentar un IC no detectado o un Ct del IC superior al corte del IC (34). Si esto ocurre, pueden obtenerse resultados incorrectos en la tipificación de la resistencia (rpoB, katG o inhA) debido a una extracción incorrecta o al

arrastre de inhibidores. Consultar la sección «Problemas y soluciones».

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse diluida en agua para biología molecular en una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Si el volumen del eluido no es suficiente, la muestra puede diluirse comenzando con la extracción de una nueva porción de la muestra en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). Consultar la sección «Problemas y soluciones».

Las muestras que el **ELITE InGenius Software** notifica como «Invalid - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de resultados. En este caso, el ADN del Internal Control no ha podido detectarse correctamente debido a problemas en el paso de amplificación o de extracción (degradación del ADN, pérdida de este durante la extracción o arrastre de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse tal cual o diluida en agua para biología molecular en una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse comenzando con la extracción de una nueva porción de la muestra en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). Consultar la sección «Problemas y soluciones».

Las muestras que el **ELITE InGenius Software** notifica como «Inconclusive - Retest Sample» (No concluyente. Repetir muestra) 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 eluido, confusión de las mezclas de PCR), que pueden dar lugar a resultados incorrectos.

Las muestras que el **ELITE InGenius Software** indica como «RIF Typing Invalid - Retest Sample» (RIF:Tipificación no válida. Repetir muestra) e «INH Typing Invalid - Retest Sample» (INH:Tipificación no válida. Repetir muestra) no son aptas para el análisis de la resistencia a los antibióticos. Esto se debe a una concentración baja de MTB en la muestra, a que no hay una cantidad suficiente de ADN (Ct de MTB superior a 31) para obtener resultados correctos de una manera reproducible o la existencia de problemas en la amplificación o en el paso de extracción (degradación del ADN, pérdida de este durante la extracción o presencia de inhibidores en el eluido). Sin embargo, **las muestras son positivas para el ADN del complejo MTB**.

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse tal cual o diluida en agua para biología molecular en una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse comenzando con la extracción de una nueva porción de la muestra en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). Consultar la sección «Problemas y soluciones».

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 eluido debe ser suficiente para dos reacciones (por lo menos 50 µL).

Las muestras que se notifican como «MTB:DNA no detectado o por debajo del 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 rendimiento»).

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 de la sesión de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados («Result Display») por personal que tenga la cualificación de administrador («Administrator») o analista («Analyst») y siga las instrucciones de la interfaz. La pantalla «Results Display» (Presentación de resultados) permite imprimir y guardar los resultados de la sesión de la muestra como «Sample Report» y como «Track Report».

C. Generación del informe de los resultados de la muestra

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

El «Sample Report» muestra los detalles de una sesión de trabajo ordenados por la muestra seleccionada (SID).

El «Track Report» muestra los detalles de una sesión de trabajo ordenados por el carril seleccionado.

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de detección (LoD)

El límite de detección (LoD) del producto **MDR/MTB ELITE MGB® Kit** se ha determinado utilizando muestras de esputo licuadas, descontaminadas e inactivadas y el instrumento ELITE InGenius.

El límite de detección se calculó analizando un panel de muestras de esputo certificadas como negativas para MTB y enriquecidas con material de referencia de *Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37Ra (ATCC), cuantificado mediante amplificación en tiempo real. Se prepararon nueve niveles de dilución de MTB, de 320 ufc/mL a 1 ufc/mL. Cada nivel de dilución se probó en 12 duplicados en el instrumento ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

El límite de detección se calculó mediante el análisis de regresión tipo Probit como la concentración que tiene un 95 % de probabilidades de ser positiva. El valor calculado para el LoD se verificó analizando 20 duplicados de muestras de esputo enriquecidas con material de referencia de MTB a la concentración declarada. El valor calculado para el LoD se verificó también para la matriz de LBA/AB analizando 20 duplicados de muestras de LBA/AB enriquecidas con material de referencia de MTB a la concentración declarada. Los resultados obtenidos son coherentes con el LoD declarado.

El LoD relativo a las muestras de líquidos serosos, orina y biopsia se verificó analizando 20 duplicados de cada matriz enriquecidos con material de referencia de MTB a una concentración de 20 ufc/mL. Los resultados obtenidos son coherentes con el LoD declarado.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Límite de detección con el sistema ELITE InGenius			
Matriz	LoD (ufc/mL)	Intervalo de confianza 95 % (ufc/ml)	
		Límite inferior	Límite superior
Esputo	6	4	15
LBA/AB	6	-	-
Líquido seroso	20	-	-
Orina	20	-	-
Biopsias	20	-	-

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

La detección de la resistencia a la rifampicina o a la isoniazida utilizando el producto **MDR/MTB ELITE MGB®** junto con el instrumento ELITE InGenius se evaluó analizando unas cuantas muestras certificadas de ADN genómico procedentes de aislados de complejo MTB resistente a los antibióticos (suministrados por un laboratorio externo) y de ADN plasmídicos, caracterizados por las mutaciones indicadas en la tabla siguiente.

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, S531F
Mutaciones en la región del codón 315 del gen katG
S315N, S315T, S315I, S315R
Mutaciones en la región promotora del gen inhA
-15T, -8A, -8C, -7A

Las muestras del ADN extraído se diluyeron y se analizaron en asociación con el sistema ELITE InGenius en modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).

Todos los aislados se detectaron como positivos para MTB y se tipificaron correctamente como resistentes a la rifampicina 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 d datos EBI ENA.

Las regiones seleccionadas para la hibridación de los cebadores 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 del ADN extraído se diluyeron y se analizaron en asociación con el sistema ELITe InGenius en modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).

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

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 cebadores y las sondas fluorescentes se verificaron con respecto a la alineación de secuencias en procariotas, incluyendo micobacterias no tuberculosas (NTM) y otros microorganismos que pueden 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 microorganismos potencialmente presentes en las muestras de esputo: *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

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

Todos los aislados analizados mediante el producto MDR/MTB ELITe MGB® Kit resultaron negativos para 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 analizadas fueron antibióticos (rifampicina e isoniazida) y componentes del esputo (mucina, sangre humana).

A cada sustancia se añadieron muestras de esputo negativas para MTB que se positizaron con el material de referencia *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración de aproximadamente 2500 ufc/mL.

Las muestras se probaron en 3 duplicados con el sistema ELITe InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

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 recogida 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 para MTB y las muestras negativas para MTB.

Una muestra de esputo negativa para MTB, positivizada con material de referencia *Mycobacterium tuberculosis* a la concentración de aproximadamente 2500 ufc/mL, y una muestra de esputo negativa para MTB fueron analizadas en tres duplicados en dos sesiones por día con el mismo lote de producto (repetibilidad entre sesiones). Tres lotes distintos de producto fueron analizados en tres días distintos (repetibilidad entre lotes) con el mismo instrumento y por el mismo operador.

Las muestras se procesaron en el sistema ELITe InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los valores Ct del complejo MTB diana (IS6110) y del Internal Control 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.

	Repetibilidad entre sesiones		Repetibilidad entre lotes	
Diana	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 para MTB y las muestras negativas para MTB.

Una muestra de esputo negativa para MTB, positivizada con material de referencia *Mycobacterium tuberculosis* a la concentración de aproximadamente 2500 ufc/mL, y una muestra de esputo negativa para MTB fueron analizadas en tres duplicados en dos sesiones por día. Tres lotes distintos de producto fueron probados en tres días distintos, en tres instrumentos distintos y por tres operadores distintos.

Las muestras se procesaron en el sistema ELITe InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los valores Ct del complejo MTB diana (IS6110) y del Internal Control 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.

Diana	Reproducibilidad	
	Ct medio	%CV Ct
MTB	30,71	1,04
IC	30,88	2,39
Diana	Tm medio	
	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 %.

Espuito: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 50 muestras clínicas de esputo positiva para MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 52 muestras clínicas de esputo negativas para MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Las muestras de esputo se recogieron, pretrataron (según se describe en la sección «Muestras y controles»), cultivaron y certificaron como positivas para MTB o negativas para MTB en 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 de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

		Cultivo		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	50	1	51
	Neg.	0	51	51
	Total	50	52	102

Todas las muestras positivas para 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 para MTB, 52 dieron un resultado válido y 51 dieron un resultado negativo 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 98,1 %.

Además, las mismas muestras positivas para MTB y negativas para MTB se analizaron también mediante otro ensayo molecular para diagnóstico *in vitro* con marcado CE y mediante baciloscopia de AFB.

De las muestras clínicas analizadas mediante otro ensayo molecular para diagnóstico *in vitro* con marcado CE, 50 dieron un resultado positivo para MTB y 50 dieron un resultado negativo para MTB, y lo mismo sucedió cuando se analizaron mediante cultivo. En la siguiente tabla se resume la comparación de los resultados con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit.

		Ensayo de diagnóstico molecular para diagnóstico <i>in vitro</i> con marcado CE		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	50	1	51
	Neg.	0	51	51
	Total	50	52	102

Todas las muestras positivas para 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 para MTB, 52 presentaron un resultado válido y 51 dieron un resultado negativo con el producto **MDR/MTB ELITE MGB® Kit**. De las 52 muestras válidas, 51 dieron un resultado negativo 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 98,1 %.

De las muestras clínicas analizadas mediante baciloscopia de AFB, 44 dieron un resultado positivo para MTB y 56 dieron un resultado negativo para 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	51	51
	Total	44	58	102

Todas las muestras positivas para MTB resultaron positivas con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit.

Entre las muestras negativas para MTB, 58 dieron un resultado válido y 51 dieron un resultado negativo 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 *in vitro* con marcado CE). 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 resistentes a los antibióticos y positivas para MTB

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia a los antibióticos, expresada como confirmación de las muestras positivas para MTB resistentes a los antibióticos, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

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

Las muestras clínicas de esputo negativas para MTB se positizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/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 *in vitro* con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Resist. RIF (<i>rpoB</i>)	Resist. INH (<i>katG</i>)	Resist. INH (<i>inhA</i>)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación <i>rpoB</i>)	20	20	0	0	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación <i>katG</i>)	20	0	17	0	3
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación <i>inhA</i>)	20	0	0	18	2

Todas las muestras resultaron positivas para MTB

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.

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 positivizadas 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 a los antibióticos es del 100 %.

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

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

Las muestras de esputo fueron recolectadas, pretratadas (según se describe en la sección «Muestras y controles»), cultivadas y certificadas como positivas para 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 de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Resistencia RIF negativa + Resistencia INH negativa	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, sensibles a los antibióticos	50	47	3

Todas las muestras resultaron ser positivas para 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 a los antibióticos es del 100 %.

LBA/AB: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 6 muestras clínicas de LBA/AB positivas para MTB sometidas a prueba mediante cultivo y 40 muestras clínicas de LBA/AB positivizadas.

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 40 muestras clínicas de LBA/AB negativas para MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Se recogieron muestras de LBA/AB, se sometieron a un tratamiento previo (tal como se describe en la sección «Muestras y controles») y, después, se colocaron en un cultivo y se certificaron como positivas para MTB o negativas para MTB en un laboratorio externo. A las muestras positivizadas se les añadieron aislados de MTB sensibles a los antibióticos a la concentración final de aproximadamente 20 ufc/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 de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

		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 para MTB o positivizadas, 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 para 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 resistentes a los antibióticos y positivas para MTB

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia a los antibióticos, expresada como confirmación de las muestras positivas para MTB resistentes a los antibióticos, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

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

Las muestras clínicas de LBA/AB negativas para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/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 *in vitro* con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina y a la isoniazida	2	0	0	0	2
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación <i>rpoB</i>)	40	40	0	0	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación <i>katG</i>)	40	0	40	0	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación <i>inhA</i>)	40	0	0	39	1

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. 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 a los antibióticos es del 100 %.

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

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

Las muestras clínicas de LBA/AB negativas para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/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 *in vitro* con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	40	0	40	40	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	40	40	0	40	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación inhA)	40	39	39	0	1

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. 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 a los antibióticos es del 100 %.

Orina: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 12 muestras clínicas de orina positivas para MTB sometidas a prueba mediante cultivo y 8 muestras clínicas de orina positivizadas.

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 20 muestras clínicas de orina negativas para MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Se recogieron muestras de orina, se sometieron a un tratamiento previo (tal como se describe en la sección «Muestras y controles») y, después, se colocaron en un cultivo y se certificaron como positivas para MTB o negativas para MTB en un laboratorio externo. A las muestras positivizadas se les añadieron aislados de MTB sensibles a los antibióticos a la concentración final de aproximadamente 20 ufc/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 de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

		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 para MTB o positivizadas, 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 para 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 resistentes a los antibióticos y positivas para MTB

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia a los antibióticos, expresada como confirmación de las muestras positivas para MTB resistentes a los antibióticos, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

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

Las muestras clínicas de orina negativas para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/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 *in vitro* con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	20	20	0	0	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	20	0	20	0	0
Muestras positivas para 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 a los antibióticos es del 100 %.

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

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

Las muestras clínicas de orina negativas para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/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 *in vitro* con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	20	0	20	20	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	20	20	0	20	0
Muestras positivas para 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 a los antibióticos es del 100 %.

Biopsias: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 22 muestras clínicas de biopsias positivas para MTB sometidas a prueba mediante cultivo y 20 muestras clínicas de biopsias positivizadas.

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 40 muestras clínicas de biopsias negativas para MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Se recogieron muestras de biopsias, se sometieron a un tratamiento previo (tal como se describe en la sección «Muestras y controles») y, después, se colocaron en un cultivo y se certificaron como positivas para MTB o negativas para MTB en un laboratorio externo. A las muestras positivizadas se les añadieron aislados de MTB sensibles a los antibióticos a la concentración final de aproximadamente 20 ufc/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 de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

		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 para MTB o positivizadas, 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 para 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 resistentes a los antibióticos y positivas para MTB

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia a los antibióticos, expresada como confirmación de las muestras positivas para MTB resistentes a los antibióticos, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

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

Las muestras clínicas de biopsias negativas para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/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 *in vitro* con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Resist. RIF (<i>rpoB</i>)	Resist. INH (<i>katG</i>)	Resist. INH (<i>inhA</i>)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación <i>rpoB</i>)	40	40	0	0	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación <i>katG</i>)	40	0	40	0	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación <i>inhA</i>)	40	0	0	40	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 a los antibióticos es del 100 %.

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

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

Las muestras clínicas de biopsias negativas para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/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 *in vitro* con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	40	0	40	40	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	40	40	0	40	0
Muestras positivas para 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 a los antibióticos es del 100 %.

Líquidos cavitarios: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 20 muestras clínicas de líquidos serosos positivas para MTB y analizadas mediante cultivo, así como 20 muestras clínicas positivizadas de líquidos serosos.

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 40 muestras clínicas de líquidos serosos negativas para MTB y analizadas mediante cultivo.

Se recopilaban muestras de líquidos cavitarios, se sometieron a un tratamiento previo (tal como se describe en la sección «Muestras y controles») y, después, se colocaron en un cultivo y se certificaron como positivas para MTB o negativas para MTB en un laboratorio externo. A las muestras positivizadas se les añadieron aislados de MTB sensibles a los antibióticos a la concentración final de aproximadamente 20 ufc/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 de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

		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 para MTB o positivizadas, 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 para 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 %.

Líquidos cavitarios: Confirmación de las muestras resistentes a los antibióticos y positivas para MTB

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia a los antibióticos, expresada como confirmación de las muestras positivas para MTB resistentes a los antibióticos, se evaluó mediante el análisis de las siguientes muestras:

- 40 muestras clínicas de líquidos cavitarios positivizadas con un aislado de MTB resistente a la rifampicina (mutación del gen *rpoB*).
- 40 muestras clínicas de líquidos cavitarios positivizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen *katG*).
- 40 muestras clínicas de líquidos cavitarios positivizadas con un aislado de MTB resistente a la isoniazida (mutación del gen *inhA*).

Las muestras clínicas de líquidos cavitarios negativas para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/mL con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo para las mutaciones en uno de los tres genes diana, para lo cual se utilizó un ensayo para diagnóstico molecular *in vitro* con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación <i>rpoB</i>)	40	40	0	0	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación <i>katG</i>)	40	0	40	0	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación <i>inhA</i>)	40	0	0	40	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 a los antibióticos es del 100 %.

Líquidos cavitarios: Confirmación de ausencia de mutación en muestras positivas para MTB

La especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia a los antibióticos, expresada como confirmación de las muestras positivas para MTB resistentes a los antibióticos, se evaluó analizando 80 muestras clínicas de líquidos cavitarios positivizadas con un aislado de MTB portador de una mutación, pero negativas para los otros dos.

Las muestras clínicas de líquidos cavitarios negativas para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/mL con aislados de MTB certificados por un laboratorio externo para las mutaciones en uno de los tres genes diana, para lo cual se utilizó un ensayo para diagnóstico molecular *in vitro* con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	40	0	40	40	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	40	40	0	40	0
Muestras positivas para 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 a los antibióticos es del 100 %.

Aspirados gástricos: Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 22 muestras clínicas de aspirados gástricos positivas para MTB sometido a prueba mediante cultivo.

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como la confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 20 muestras clínicas de aspirados gástricos negativas para MTB sometidas a prueba mediante cultivo.

Se recogieron muestras de aspirados gástricos, se sometieron a un tratamiento previo (tal como se describe en la sección «Muestras y controles») y, después, se colocaron en un cultivo y se certificaron como positivas para MTB o negativas para MTB en 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 de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

		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 para 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 para 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 resistentes a los antibióticos y positivas para MTB

La sensibilidad diagnóstica del ensayo de resistencia a los antibióticos, expresada como confirmación de las muestras positivas para MTB resistentes a los antibióticos, 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 para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/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 in vitro con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Resist. RIF (rpoB)	Resist. INH (katG)	Resist. INH (inhA)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	20	20	0	0	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	20	0	20	0	0
Muestras positivas para 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 a los antibióticos es del 100 %.

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

La especificidad diagnóstica del ensayo de resistencia a los antibióticos, expresada como confirmación de las muestras positivas para MTB resistentes a los antibióticos, 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 para MTB se positivizaron a la concentración final de aproximadamente 5000 ufc/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 in vitro con marcado CE. Las muestras se probaron con el producto MDR/MTB ELITE MGB® Kit y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas al MTB	Sens. RIF (rpoB)	Sens. INH (katG)	Sens. INH (inhA)	Tipificación no válida
Muestras positivas para MTB, resistentes a la rifampicina (mutación rpoB)	20	0	20	20	0
Muestras positivas para MTB, resistentes a la isoniazida (mutación katG)	20	20	0	20	0
Muestras positivas para 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 a los antibióticos 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 instrumento 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, líquidos cavitarios, biopsias y aspirados gástricos licuadas, 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.

En la actualidad, no se dispone de datos relativos al rendimiento del producto con las siguientes muestras clínicas: líquido cefalorraquídeo (LCF), materiales necróticos, pus, heces y sangre.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de que las muestras se identifiquen, recojan, transporten, conserven y procesen de forma apropiada. Por lo tanto, con el fin de evitar resultados incorrectos, es necesario prestar especial atención durante estos pasos y seguir estrictamente las instrucciones incluidas con los productos para la extracción de ácidos nucleicos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, el método de amplificación en tiempo real utilizado en este producto puede desarrollar contaminación cruzada con las muestras positivas, los controles positivos y los propios productos de amplificación. Las contaminaciones cruzadas dan lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto puede limitar la contaminación cruzada. No obstante, esta solo puede evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estas instrucciones de uso.

Para utilizar este producto y con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, se requiere personal cualificado y con la formación necesaria para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, este producto requiere el uso de ropa de trabajo y áreas que sean adecuadas para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de ropa de trabajo e instrumentos especiales expresamente destinados a la configuración de la sesión de trabajo de que se trate.

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

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que el ADN de la diana no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra. No obstante, no puede descartarse que el ADN de la diana tenga un título inferior al límite de detección del producto (consultar el apartado «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden ser no válidos debido a un error del Internal Control. En este caso, la muestra debe volver a analizarse, comenzando por la extracción, lo que puede implicar 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 cebadores y las sondas del producto pueden perjudicar la detección del ADN diana.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, existe un riesgo residual de obtener con él 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 Positive Control	
Posibles causas	Soluciones
Error en la configuración de la sesión.	Revisar la posición de la mezcla PCR Mix y del Positive Control. Revisar los volúmenes de la mezcla PCR Mix y del Positive Control.
Degradación del Positive Control.	Utilizar una nueva porción del Positive Control.
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	Utilizar una nueva porción de la PCR Mix.
Error del instrumento.	Contactar con la asistencia técnica de ELITechGroup.
Reacción no válida del Negative Control	
Posibles causas	Soluciones
Error en la configuración de la sesión.	Revisar la posición de la mezcla PCR Mix y del Negative Control. Revisar los volúmenes de la mezcla PCR Mix y del Negative Control.
Contaminación del Negative Control	Utilizar una nueva porción de agua para biología molecular.
Contaminación de la PCR Mix.	Use nuevas porciones 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 y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.
Error del instrumento.	Contactar con la asistencia técnica de ELITechGroup.
Reacción no válida de la muestra	
Resultados no concluyentes/Tipificación no válida	
Posibles causas	Soluciones
Error en la configuración de la sesión.	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 Internal Control.	Usar nuevas porciones del Internal Control.
Inhibición debido a sustancias interferentes con las muestras.	Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Repetir la extracción con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	Utilizar una nueva porción de la PCR Mix.
Error del instrumento.	Contactar con la asistencia técnica de ELITechGroup.
Detección de ADN de MTB sin detección del IC o Ct del IC superior al valor de corte del IC	
Posibles causas	Soluciones
Posible inhibición en la muestra	Repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Repetir la extracción comenzando con una dilución 1:2 de una nueva porción de la muestra en agua para biología molecular

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, proceder de la manera siguiente: - Seleccionar el carril relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado. Si se requiere un valor Ct: - Repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) o - Repetir la extracción con una dilución de 1:10 en agua de grado molecular para biología de la muestra primaria extraída en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

SÍMBOLOS

REF

Número de catálogo.



Límite superior de temperatura.

LOT

Código de lote.



Utilizar antes de (último día del mes).

IVD

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



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.



Consultar las instrucciones de uso.

CONT

Contenido.



Manténgase fuera de la luz del sol



Fabricante.

NOTA PARA LOS USUARIOS

Cualquier incidente grave que se produzca en relación con el producto deberá comunicarse al fabricante y a las autoridades competentes del Estado miembro en el que resida el usuario o el paciente. Para informar a ELITechGroup S.p.A., que es el fabricante de este producto, debe utilizarse la dirección de correo electrónico egspa.vigilance@elitechgroup.com.

No obstante, cuando este sistema informático se encuentre en funcionamiento, se proporcionará un «Resumen de seguridad y rendimiento» a través de la base de datos europea sobre productos sanitarios (Eudamed). Antes de que se publique la declaración de plena funcionalidad de Eudamed, el «Resumen de seguridad y rendimiento» se pondrá a disposición del público sin retrasos indebidos cuando se solicite escribiendo un correo electrónico a la dirección emd.support@elitechgroup.com.

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Este producto contiene reactivos fabricados por Thermo Fisher Scientific, que se venden conforme a acuerdos de licencia entre ELITechGroup S.p.A. y sus afiliadas y Thermo Fisher Scientific. El precio de compra de este producto incluye derechos limitados y no transferibles para utilizar únicamente esta cantidad de producto exclusivamente para las actividades del comprador directamente relacionadas con el diagnóstico humano. Para obtener información sobre la compra de una licencia de este producto para fines distintos de los establecidos anteriormente, contactar con Licensing Department, da Thermo Fisher Scientific, 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 una o varias patentes de EE. UU., 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 así como por patentes europeas, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 y por solicitudes de patentes actualmente pendientes.

Esta licencia limitada permite a la persona, o a la entidad legal a la que se ha suministrado el producto, utilizar este producto y los datos generados con el uso de este exclusivamente para el diagnóstico en humanos. Ni ELITechGroup S.p.A. ni sus licenciarios conceden ninguna otra licencia, expresa o implícita, para cualquier 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*	98.1% 51/52*
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

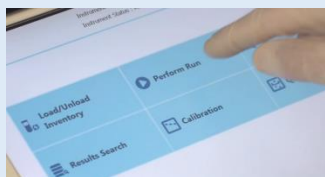
The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

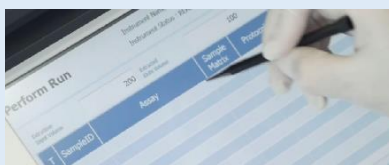
1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify controls: TB pos. and neg. controls in the "Control menu" NB: Both have been run, approved and not expired	3. Thaw TB1 and TB2 PCR Mixes and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen



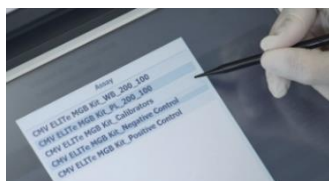
2. Verify the extraction volumes:
Input: "200 µL", eluate: "100 µL"



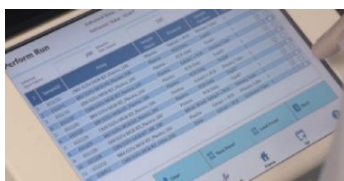
3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID



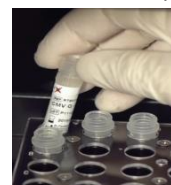
4. Select the "Assay protocol" of interest



5. Select the sample position:
"Extraction tube"



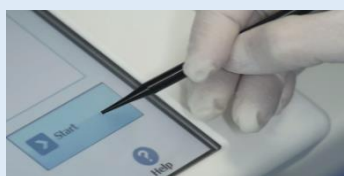
6. Load the PCR Mixes and the Internal Control in the inventory block



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*