

**genetic PCR solutions™**

*30 years' experience, packed in microtubes*

**MTplex  
dtec-qPCR  
formato F100  
100 tests**

Detección genética de  
*Mycobacterium tuberculosis complex*



Número de Licencia Sanitaria de Funcionamiento de  
Instalación de Productos Sanitarios; 7722-PS

Edición E03 (10/2023)

#### AVISOS, RENUNCIAS Y MARCAS

Los productos incluidos en el presente kit se venden para su uso en aplicaciones de diagnóstico *in vitro*. No pueden ser revendidos, distribuidos o reempaquetados sin la autorización expresa por escrito de GPS™. Las secuencias desarrolladas de cebadores y sondas contenidas en esta mezcla son propiedad industrial desarrollada por GPS™. Las licencias independientes diferentes de las mencionadas para aplicaciones de este producto pueden estar disponibles. Por favor, pregunte a través de [info@geneticpcr.com](mailto:info@geneticpcr.com).

La PCR es una tecnología cubierta por varias patentes estadounidenses y equivalentes en otros países. Estas patentes son propiedad de Roche Molecular Systems Inc. y han sido sub-licenciadas por PE Corporation, o licenciadas en ciertos campos por Roche de Life Technologies (anteriormente Applied Biosystems, grupo de Applied Biosystems Corporation). Dependiendo de la aplicación específica que haga, puede necesitar una licencia de Roche o Life Technologies para practicar ciertos aspectos de la PCR. Adicionalmente, los ensayos de nucleasas en 5' y ciertos métodos de amplificación homogéneos en conexión con el proceso de PCR pueden ser reclamados por ciertas patentes de Roche o Life Technologies. Las consultas sobre la obtención de una licencia pueden hacerse contactando al Director de Licencias, Life Technologies, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 o el Departamento de Licencias de Roche Molecular Systems Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, CA 94501.

GPS™ es una marca comercial de GENETIC ANALYSIS STRATEGIES SL. La compra de este producto de GPS™ no puede interpretarse como una autorización o licencia implícita bajo los derechos de patente de propiedad de Roche o Life Technologies.

## ÍNDICE

Descripción .....	2
Principio del método .....	3
Contenido del kit .....	3
Condiciones de almacenamiento .....	4
Materiales requeridos pero no provistos .....	4
Advertencias y precauciones .....	5
Protocolo de resuspensión .....	6
Preparación del Positive Control .....	6
Preparación de la dilución decimal .....	7
Protocolo de PCR .....	8
Régimen de amplificación .....	9
Controles de reacción recomendados .....	10
Interpretación de resultados .....	11
Evaluación del funcionamiento y evidencia clínica .....	13
Certificado de análisis .....	16
Requisitos reglamentarios .....	16
Información de contacto .....	16
Símbolos armonizados y abreviaturas .....	17

### DESCRIPCIÓN

**MTplex dtec-qPCR** comprende una serie de reactivos específicos, para diagnóstico clínico humano, diseñados para la detección del ***Mycobacterium tuberculosis complex*** mediante qPCR. *Mycobacterium tuberculosis complex* se refiere a un conjunto de variantes pertenecientes a *Mycobacterium tuberculosis* con capacidad de provocar tuberculosis en humanos y otros animales. Se trata de bacterias patógenas obligadas, aeróbicas, que ocasionan lesiones nodulares en los pulmones, conocidas como tubérculos. En la actualidad, este grupo incluye a las variantes tuberculosis, *africanum*, *orygis*, *bovis* y *bovis BCG*, *caprae*, *microti*, *canettii*, *suricattae*, *pinnipedii* y *mungi*.

## PRINCIPIO DEL MÉTODO

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación de una región diana de un molde DNA usando oligonucleótidos específicos. En la PCR a tiempo real (qPCR), el producto amplificado acumulado puede ser detectado en cada ciclo mediante marcadores fluorescentes. Esta señal creciente, permite lograr una detección y cuantificación de patógenos con elevada sensibilidad.

## CONTENIDO DEL KIT

**TargetSpecies dtc-qPCR-mix (TUBO ÁMBAR)**, contiene una mezcla de cebadores específicos y sonda, a una concentración óptima deshidratada después de la síntesis. 100 reacciones

**Resuspension buffer (TAPÓN BLANCO)**, 130  $\mu$ l

**DNase/RNase free water (TAPÓN VERDE)**, 1.5 ml

**Internal Control qPCR-mix (TUBO ÁMBAR)**, contiene una mezcla de cebadores, sonda y molde DNA para conseguir un adecuado control interno de la PCR. 100 reacciones

**GPS™-mix (TAPÓN AZUL)**, es una mastermix 4x que contiene una DNA polimerasa, dNTPs y tampón. 500  $\mu$ l, 100 reacciones

**Positive Control (TAPÓN NARANJA)**, molde deshidratado de la diana para el control positivo.

**Template buffer (TAPÓN NEGRO)**, exclusivo para la resuspensión del Positive Control, 150  $\mu$ l

### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Todos los componentes del **MTplex dtect-qPCR** son estables a temperatura ambiente para su transporte. Tras la llegada, si no van a ser utilizados inmediatamente, deben ser almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El producto es estable durante un año (ver fecha de caducidad en la etiqueta). Una vez abierto y disuelto, para evitar numerosos ciclos de congelación/descongelación que pueden reducir la sensibilidad del ensayo, recomendamos dividir el contenido en varias alícuotas y almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**GPS™-mix (TAPÓN AZUL)** es estable a temperatura ambiente para su transporte, pero debe ser almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a su llegada.

Para el **Positive Control (TAPÓN NARANJA)** recomendamos, una vez disuelto, almacenar **en una caja exclusiva** a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

- Kit de extracción de DNA, es necesario un método apropiado de extracción de ácidos nucleicos para obtener DNA puro libre de inhibidores de la PCR.
- (OPCIONAL) Agua libre de DNasas/RNasas y tubos de baja retención certificados (preparación de la dilución decimal)
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para la pipeta
- Tubos de qPCR, tiras o placas
- Mezclador vórtex
- Micro-centrifuga
- Bloque refrigerado
- Equipo de PCR a Tiempo Real que debe leer en el canal FAM (diana) y VIC/HEX/JOE (control interno)

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- ① Para su uso en diagnóstico *in vitro* (IVD)
- ① Para evitar un mal uso, lea atentamente el manual.
- ① Se requiere un especialista con la formación adecuada en biología molecular para el correcto funcionamiento del kit.
- ① De acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, use siempre bata, guantes desechables y gafas protectoras.
- ① Todos los instrumentos utilizados deben ser verificados y calibrados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- ① Las muestras son material potencialmente infeccioso, tome medidas adecuadas para la contención y siga las precauciones de bioseguridad.
- ① La validación del ensayo se realizó con muestras clínicas de esputo. Cualquier tipo de muestra que contenga especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* puede analizarse tras la extracción apropiada del material genético.

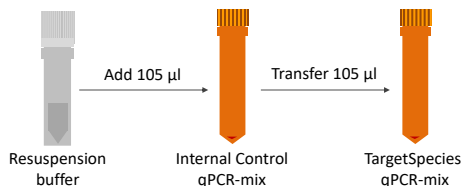
### Precauciones generales

- ⚠ Para evitar contaminación de micropipetas, use puntas estériles con filtro.
- ⚠ Las micropipetas utilizadas para diluir el Positive Control no deben utilizarse para otros reactivos de la PCR.
- ⚠ Extraer, almacenar y preparar los materiales positivos (muestras, controles positivos y productos de PCR) en un entorno independiente.
- ⚠ Para disminuir el riesgo de contaminación, recomendamos que todo el pipeteo se realice en un ambiente limpio de PCR. Idealmente, un laboratorio específico para PCR o una cabina de PCR
- ⚠ Para evitar la contaminación cruzada con el control positivo, pipetear después de cerrar los tubos del control negativo y las muestras.
- ⚠ El flujo de trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional, desde el área de preamplificación limpia hasta el área de amplificación.
- ⚠ Mantenga los reactivos en un bloque frío.
- ⚠ Proteger los cebadores/sonda de una exposición prolongada a la luz.
- ⚠ Cualquier incidencia relacionada con el producto, debe ser informada a GPS™ (INFORMACIÓN DE CONTACTO).

### PROTOCOLO DE RESUSPENSIÓN

#### Resuspensión de TargetSpecies dtec-qPCR-mix con Internal Control

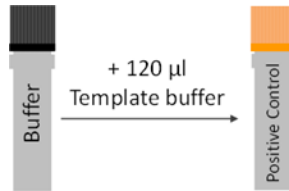
Para la reconstitución del **Internal Control qPCR-mix (TUBO ÁMBAR)** y el **TargetSpecies dtec-qPCR-mix (TUBO ÁMBAR)** y antes de abrirlo, realizar un pulso de centrifuga para asegurar que todo el producto liofilizado va a la parte inferior del tubo. Añadir 105  $\mu\text{l}$  de **Resuspension buffer (TAPÓN BLANCO)** al **Internal Control qPCR-mix (AMBER TUBE)**, resuspender el tubo mediante vórtex, y recolectar el volumen en la parte inferior mediante un pulso de centrifuga. Transferir el volumen al tubo de **TargetSpecies dtec-qPCR-mix (AMBER TUBE)**, resuspender nuevamente el tubo mediante vórtex, y recolectar el volumen en la parte inferior mediante un pulso de centrifuga. Utilizar 1  $\mu\text{l}$  de esta suspensión en las reacciones de PCR con un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ .



### PREPARACIÓN DEL POSITIVE CONTROL

El **Positive Control (TAPÓN NARANJA)** sellado contiene un molde puro y existe un riesgo significativo de contaminación. Para evitar la contaminación, por favor, siga las recomendaciones de la sección ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES de este manual. Para preparar el **Positive Control (TAPÓN NARANJA)** realizar un pulso de centrifuga, reconstituir con 120  $\mu\text{l}$  de **Template Buffer (TAPÓN NEGRO)**, mezclar bien mediante vórtex y realizar un pulso de centrifuga.



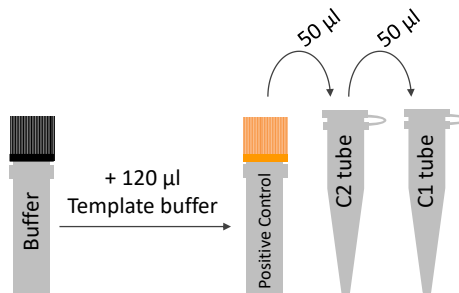


Pipetear 5 µl del molde en cada pocillo/tubo de acuerdo con la configuración de la placa. El volumen final en cada pocillo de reacción de qPCR es de 20 µl.

## PREPARACIÓN DE LA DILUCIÓN DECIMAL

Cuando se requiera cuantificación, se pueden preparar las siguientes diluciones.

- 1) Pipetear 450 µl de **agua libre de DNAsas/RNAsas** (no incluida) en dos tubos y rotular de C2 a C1
- 2) Realizar un pulso de centrifuga al **Positive Control** (**TAPÓN NARANJA**), reconstituir con 120 µl de **Template buffer** (**TAPÓN NEGRO**) y resuspender mediante vórtex
- 3) Pipetear 50 µl del **Positive Control** (**TAPÓN NARANJA**) diluido en el tubo C2
- 4) Vórtex y pulso de centrifuga
- 5) Cambiar la punta y pipetear 50 µl del tubo C2 en el tubo C1
- 6) Vórtex y pulso de centrifuga



Dilución decimal seriada	copias/ $\mu$ l	copias en 5 $\mu$ l
Positive Control (TAPÓN NARANJA)	$2 \times 10^2$	$10^3$
Tubo C2	$2 \times 10$	$10^2$
Tubo C1	2	10

Pipetear 5  $\mu$ l del molde en cada pocillo/tubo de acuerdo con la configuración de la placa. El volumen final en cada pocillo de reacción de qPCR es de 20  $\mu$ l.

### PROTOCOLO DE PCR

Es recomendable preparar una pre-mix de reacción en un tubo libre de nucleasas en un bloque frío, siguiendo las indicaciones de la siguiente tabla. Preparar suficiente pre-mix para el número de reacciones deseadas, incluyendo las muestras y los controles positivo/negativo necesarios para el experimento.

Reactivo	Volumen
DNase/RNase free water (TAPÓN VERDE)	9 $\mu$ l
GPS™-mix (TAPÓN AZUL)	5 $\mu$ l
TargetSpecies dtec-qPCR-mix (TUBO ÁMBAR)	1 $\mu$ l
Volumen de la pre-mix de reacción	15 $\mu$ l

Una vez preparada, pipetear 15  $\mu$ l de la pre-mix en cada pocillo/tubo de PCR, según su plataforma experimental.

Añadir 5  $\mu$ l de muestra extraída o, en el caso de la curva de calibrado/control positivo, la correspondiente dilución del molde a cada tubo de PCR para alcanzar un volumen final de 20  $\mu$ l.

Reactivo	Volumen
Pre-mix de reacción dispensada	15 µl
Muestra (o DNase/RNase free water) <sup>1</sup>	5 µl
<b>VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN</b>	<b>20 µl</b>

<sup>1</sup> En el caso del control negativo, añadir 5 µl de DNase/RNase free water (**TAPÓN VERDE**) en vez de muestra (ver Controles de Reacción Recomendados).

## RÉGIMEN DE AMPLIFICACIÓN

Una vez todas las reacciones están preparadas y correctamente cerradas, realizar un vórtex y un pulso en la centrífuga. Colocar la placa o los tubos en el bloque/rotor del termociclador programado con el régimen térmico descrito en la tabla. Tener en cuenta que la señal fluorescente debe recogerse usando el canal FAM para la diana y el canal HEX para el control interno. La sonda incluye un Dark Quencher que puede programarse como cualquier quencher no fluorescente (NFQ) en el software.

Fast-Cycling	Paso	Tiempo	Temperatura
40 Ciclos	Activación	2 min	95 °C
	Desnaturalización	1 sec	95 °C
	Hibridación / Extensión y recolección de datos <sup>1</sup>	10 sec	<b>60 °C</b>

<sup>1</sup> La señal de fluorescencia debe recogerse durante este paso usando el canal **FAM** para la diana y el canal **HEX** para el control interno.

Los reactivos de GPS™ son compatibles con todos los aparatos de qPCR del mercado. El uso de un marcador pasivo como el ROX no es necesario.

### CONTROLES DE REACCIÓN RECOMENDADOS

Los siguientes controles de reacción para la qPCR están recomendados en base a las directrices de la norma UNE/EN ISO 17025. Al poner a punto el protocolo de qPCR, seleccione los controles que considere que mejor se adapten a su sistema de calidad.

**Control Negativo** (Ctrl -): Añadir 5 µl de DNase/RNase free water (**TAPÓN VERDE**) a 15 µl de pre-mix de reacción. Esta reacción debería ser negativa. Un resultado positivo debe considerarse como un síntoma de contaminación en alguno de los reactivos, haciendo el ensayo poco concluyente. Los reactivos deben ser eliminados.

**Control Positivo** (Ctrl +): Preparar el **Positive Control** (**TAPÓN NARANJA**) como se describe arriba. Añadir 5 µl del Positive Control a 15 µl de pre-mix de reacción. Un resultado positivo indica que la qPCR funciona correctamente. Si es negativo, el ensayo debe ser repetido después de comprobar el protocolo térmico.

**Control de Extracción Negativo** (ExtCtrl -): Realizar una extracción siguiendo el protocolo sin añadir ningún tipo de muestra. Añadir 5 µl de la muestra de extracción negativa a 15 µl de la pre-mix de reacción. En este caso, el ensayo incluye los reactivos usados durante los pasos de extracción. Si es positivo, cuando el **Control Negativo** es negativo, una contaminación ha tenido lugar durante el proceso de extracción. Los reactivos de la extracción deben ser eliminados.

**Control de Extracción Positivo** (ExtCtrl +): Realizar una extracción de acuerdo con el protocolo de extracción añadiendo el **Positive Control** (**TAPÓN NARANJA**), o DNA extraído de cultivo puro, al primer tampón del protocolo de extracción. El control de extracción positivo informa sobre el rendimiento del método de extracción utilizado. Es esperable un resultado positivo. Si fuese negativo, la extracción debe ser cuidadosamente repetida o el método de extracción reemplazado.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Si se prepara la dilución decimal para la cuantificación, la regresión lineal del logaritmo del número de copias frente al Ct proporciona las constantes intersección-Y y pendiente de la recta de calibrado (ecuación 1). El número de copias en la muestra se puede calcular basándonos en la regresión (ecuación 2).

$$Ct = Y \text{ intercept} + Slope \times \log(\text{copy number}) \quad (1)$$

$$\text{Copy number} = 10^{\frac{(Ct - Y \text{ intercept})}{Slope}} \quad (2)$$

Para obtener la cuantificación de la muestra directamente del equipo, la dilución decimal seriada debe definirse en el software del equipo de PCR como Standard con las copias correspondientes a cada dilución (ver PREPARACIÓN DE LA DILUCIÓN DECIMAL). La recta estándar puede definirse en número total de copias o en copias/ $\mu$ l.

Para referir los valores obtenidos mediante qPCR al material de partida, por favor tenga en cuenta el volumen de elución tras la extracción, el volumen de muestra procesada y cualquier dilución realizada.

Ctrl -	Ctrl +	Muestra	IC	ExtCtrl -	Interpretación
+	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	Reactivos de PCR contaminados
-	-	+ / -	+ / -	+ / -	Experimento fallido
-	+	+ / -	+ / -	+	Contaminación durante la extracción
-	+	-	+	-	<b>Muestra negativa</b>
-	+	+	+ / -	-	<b>Muestra positiva</b>
-	+	-	-	-	Inhibición de la PCR

Los símbolos + y - significan amplificación positiva o negativa, respectivamente.

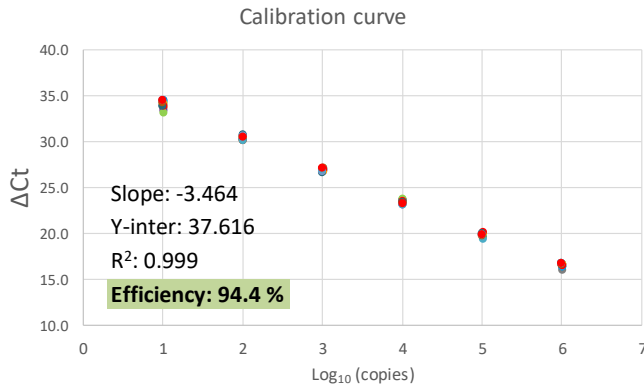
Si se observa inhibición, se recomienda una dilución de la muestra a 1/10 (si la concentración no está cerca del límite de detección) o la purificación de la muestra debe repetirse.

Por lo general, en una qPCR con una eficiencia del 100%, 36 ciclos son suficientes para amplificar menos de 10 copias. Eso no significa que  $Ct > 36$  no tenga relevancia, pero para aceptar un valor de  $Ct$  más alto (expresión baja), hay más requisitos de laboratorio: prevención de la contaminación, control de los niveles de inhibición y verificación a lo largo del tiempo de las muestras con un positivo bajo. Esta evaluación debe ser realizada por el cliente con el protocolo completo, en su laboratorio, con su dispositivo qPCR, muestras y matrices. Solo así se puede establecer un criterio robusto.

## EVALUACION DEL FUNCIONAMIENTO Y EVIDENCIA CLÍNICA

### Sensibilidad analítica

Para la calibración y el análisis estadístico, el estudio de linealidad se realizó con seis rangos de dilución decimal de  $10^6$  copias a 10 copias. Cada parámetro se analizó al menos 10 veces para lograr condiciones de reproducibilidad. El análisis estadístico requerido se realizó representando los datos de Ct de las diluciones contra el logaritmo del número de copias en un gráfico y los parámetros de la ecuación se determinaron para la Pendiente, la Intersección del eje Y y la Eficiencia.



El análisis de regresión lineal dio un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.999$  con una pendiente de -3.464 y una intersección en el eje Y de 37.616. La eficiencia de amplificación (E) se estimó utilizando la pendiente de la curva estándar, obteniéndose un valor de **94.4 %**.

La validación del rendimiento de la regresión lineal se verificó con un modelo basado en la *prueba de Fisher* con un intervalo de confianza de 0.05. El valor experimental calculado (0.403) fue menor que el valor teórico de Fisher (5.318).

### Verificación del límite de detección (LOD)

Estimar el LOD implica conocer el menor número de unidades de la diana que generan resultados de amplificación positivos con un nivel de confianza del 90%. Se analizaron un total de 15 reacciones. La diana se puede detectar al menos hasta **10 copias** con un 100.0% de confianza.

### Verificación del límite de cuantificación (LOQ)

Estimar el LOQ de la PCR implica conocer el menor número de unidades de la diana que generan un resultado repetible de cuantificación. La validación se basa en la prueba *T de Student*. Se analizaron un total de 15 reacciones. El valor experimental obtenido de **0.003** es menor que el valor de la *Tstudent* de 2.145; el **LOQ** para el ensayo se establece en **10 copias**.

### Precisión del análisis

La precisión es la capacidad de un método para producir resultados libres de errores aleatorios. El parámetro se estima mediante la evaluación de la repetibilidad y la reproducibilidad. **Repetibilidad**. Se analizaron 10 réplicas de 1 dilución de seis rangos de la curva estándar ejecutados con el mismo dispositivo, día y técnico. **Reproducibilidad**. Los valores obtenidos de las curvas estándar se elaboraron por diferentes técnicos, fechas y dispositivos. El coeficiente de variación (CV) de la repetibilidad y la reproducibilidad se detallan para cada nivel.

Copias	Coeficiente de variación % (CV)	
	Repetibilidad	Reproducibilidad
1000000	0.72 %	0.94 %
100000	0.38 %	0.45 %
10000	0.62 %	0.55 %
1000	0.97 %	1.22 %
100	1.24 %	1.23 %
10	2.51 %	2.35 %



### Especificidad analítica

La especificidad es la capacidad del método para reconocer la diana específicamente y distinguirlo de dianas similares. Se realizó una primera verificación de cebador *in silico* después del trabajo de diseño mediante búsqueda de similitud utilizando el software apropiado de las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Además, una vez que se sintetizaron los cebadores, se verificó *in vitro* la inclusividad experimentalmente con las especies del complejo *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, y *M. caprae*.

### Evaluación clínica

Se analizaron un total de 126 muestras, 80 muestras del laboratorio de referencia *Instituto de Salud Carlos III* (ISCIII) y 46 del Central Tuberculosis Research Institute of Russian Academy of Medical Sciences (CTRI) para calcular la Sensibilidad Diagnóstica (proporción de positivos identificados correctamente) y la Especificidad Diagnóstica (proporción de negativos identificados correctamente).

MTplex dtec-qPCR		Técnica de referencia			
Muestras totales	126	Positivas	93	Negativas	33
Positivas	91	Verdaderos positivos	91	Falsos positivos	0
Negativas	35	Falsos negativos	2	Verdaderos negativos	33

La sensibilidad diagnóstica se evaluó con 93 muestras positivas para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, obteniéndose un valor de 97.9 %. La especificidad diagnóstica se evaluó con 33 muestras negativas para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, obteniéndose un valor de 100.0 %. La eficiencia diagnóstica fue del 98.4 %.

### CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Todos los lotes se calibran con una curva estándar de  $10^6$  a 10 copias de molde. Se evalúan diversos parámetros: Ct, pendiente,  $R^2$  y eficiencia. Toda esta información está disponible en el **Quality Certification** proporcionado al cliente por GPS™.

### REQUISITOS REGLAMENTARIOS

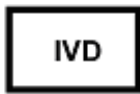
Los productos son conformes con los requisitos esenciales de aplicación y cumplen las disposiciones del Real Decreto 1662/2000 (Directiva Europea 98/79/CE) por el que se regulan la fabricación de productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.

### INFORMACIÓN DE CONTACTO

Para cualquier pregunta y soporte técnico, contacte con nuestra dirección [support@geneticpcr.com](mailto:support@geneticpcr.com). Para presupuestos, pedidos o diseños para nuevas dianas, por favor contacte [orders@geneticpcr.com](mailto:orders@geneticpcr.com).

## SÍMBOLOS ARMONIZADOS Y ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico	qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico	RT	Transcripción reversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real con transcripción reversa		



Diagnóstico in vitro



Fabricante



Marcado CE



Fecha de fabricación



Número de lote



Fecha de caducidad



Precaución



Rango de temperatura



Consulte las instrucciones



Proteger de la exposición a la luz



## **Genetic PCR Solutions™**

by **GENETIC ANALYSIS STRATEGIES S.L**

Av. Dr. Gómez-Pardo Ródenas, 1  
03300-Orihuela (Alicante)

☎ Phone: +34-965429901

💻 Web: [www.geneticpcr.com](http://www.geneticpcr.com)

✉ e-mail: [info@geneticpcr.com](mailto:info@geneticpcr.com)

