

genetic PCR solutions™

30 years' experience, packed in microtubes

MTplex
qPCR
formato F100
100 tests

Detección genética de
Mycobacterium tuberculosis complex



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

AVISOS, RENUNCIAS Y MARCAS

Los productos incluidos en el presente kit se venden para su uso en aplicaciones de Diagnóstico In Vitro (CE-IVD). No pueden ser revendidos, distribuidos o reempaquetados sin la autorización expresa por escrito de GPS™. Las secuencias de cebadores y sondas contenidas en este producto son una propiedad industrial desarrollada por GPS™.

GPS™ es una marca registrada de GENETIC ANALYSIS STRATEGIES SL. La compra de este producto no debe interpretarse como una autorización o licencia implícita bajo ningún derecho de patente propiedad de otras entidades.

ÍNDICE

DESCRIPCIÓN	2
ESPECIE DE DESTINO Y NATURALEZA DE LA MUESTRA.....	2
PRINCIPIO DEL MÉTODO	3
CONTENIDO DEL KIT	3
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.....	4
MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS	4
NOTAS IMPORTANTES	5
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 FUNCIONAMIENTO Y EVIDENCIA CLÍNICA	13
CERTIFICADO DE ANÁLISIS.....	16
REQUISITOS REGLAMENTARIOS	16
INFORMACIÓN DE CONTACTO	16
SÍMBOLOS ARMONIZADOS Y ABREVIATURAS.....	17

DESCRIPCIÓN

El MTplex qPCR comprende una serie de reactivos específicos para diagnóstico clínico humano, diseñados para la detección de ***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 patogénicas 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*. Aunque la especie recientemente descrita *M. mungi*, aún no ha sido validada, se ha informado que contiene el elemento genético específico de este complejo que se ha utilizado como diana del ensayo. Recientemente se ha considerado que todos los miembros de este complejo son parte de la especie *M. tuberculosis* y se están reclasificando como variantes de la misma.

ESPECIE DE DESTINO Y NATURALEZA DE LA MUESTRA

El ensayo está diseñado para su uso en muestras respiratorias humanas, específicamente esputos y lavados bronquiales.

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 qPCR-mix (**TUBO ÁMBAR**), contiene una mezcla deshidratada de cebadores y sonda específicos. 100 reacciones.

Resuspension buffer (**TAPÓN BLANCO**), 130 µl

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

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

GPS™-mix (**TAPÓN AZUL**), es una mastermix 4X en solución que contiene una polimerasa, dNTPs y tampón. 500 µl, 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 µl

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Todos los componentes del **MTplex qPCR** son estables a temperatura ambiente para su transporte. Tras su llegada deben ser almacenados entre -15 y -25 °C si no van a ser utilizados inmediatamente. El producto es estable durante un año (ver fecha de caducidad en la etiqueta).

Para el **Positive Control** (**TAPÓN NARANJA**) recomendamos, una vez disuelto, almacenar entre -15 y -25 °C **en una caja exclusiva**.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

- Kit de extracción de ácidos nucleicos, es necesario un método apropiado de purificación para obtener DNA o RNA puro libre de inhibidores de la PCR
- Agua libre de DNases/RNases y tubos de baja retención certificados para la preparación de la dilución decimal en caso de cuantificación
- Micropipetas y puntas de pipeta estériles con filtro
- Tubos de qPCR, tiras o placas
- Mezclador vórtex y centrífuga de bajas revoluciones
- Bloque de enfriamiento
- Equipo de PCR a Tiempo Real que debe leer en el canal FAM (diana) y el canal VIC/HEX/JOE (control interno)

NOTAS IMPORTANTES

- Para su uso en Diagnóstico In Vitro (IVD).
- Para evitar un mal uso, lea atentamente el manual.
- Se requiere un especialista con la formación adecuada en biología molecular para el correcto funcionamiento del kit.
- De acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, use siempre bata, guantes desechables y gafas protectoras.
- Todos los instrumentos utilizados deben ser verificados y calibrados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- Las muestras son material potencialmente infeccioso, tome medidas adecuadas para la contención y siga las precauciones de bioseguridad.
- Cualquier tipo de muestra puede analizarse con este ensayo tras la extracción apropiada del material genético.

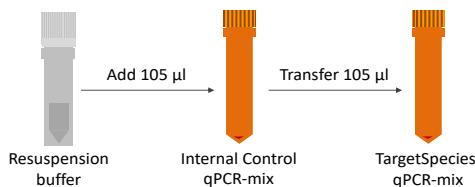
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- ⚠ 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.
- ⚠ Para virus dsRNA, preincubar la muestra a 95 °C durante 5 minutos.
- ⚠ Cualquier incidencia relacionada con el producto, debe ser informada a GPS™ (ver INFORMACIÓN DE CONTACTO).

PROTOCOLO DE RESUSPENSIÓN

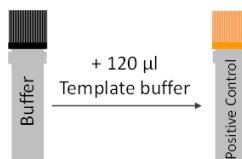
Resuspensión de TargetSpecies qPCR-mix con Internal Control

Para la reconstitución del **Internal Control qPCR-mix** (**TUBO ÁMBAR**) y el **TargetSpecies qPCR-mix** (**TUBO ÁMBAR**), realizar un pulso de centrífuga para asegurar que todo el producto deshidratado va a la parte inferior del tubo antes de abrirlo. Añadir 105 µl 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 centrífuga. Transferir el volumen al tubo de **TargetSpecies qPCR-mix** (**AMBER TUBE**), resuspender nuevamente el tubo mediante vórtex, y recolectar el volumen en la parte inferior mediante un pulso de centrífuga. Utilizar 1 µl de esta suspensión en las reacciones de PCR con un volumen final de 20 µl.



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 centrífuga, reconstituir con 120 µl de **Template Buffer** (**TAPÓN NEGRO**), mezclar bien mediante vórtex y realizar un pulso de centrífuga.

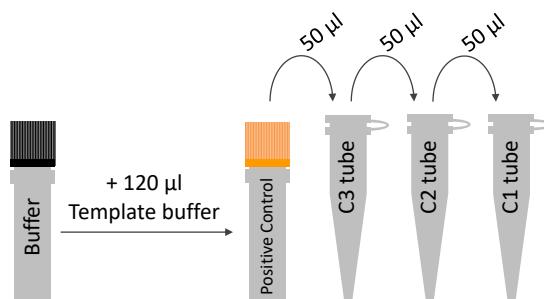


Pipetear 5 µl del molde en cada pocillo/tubo de acuerdo con la configuración de la placa. El volumen final en cada pocillo de reacción de qPCR es de 20 µl.

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 tres tubos y rotular de C3 a C1
- 2) Realizar un pulso de centrífuga al **Positive Control (TAPÓN NARANJA)**, reconstituir con 120 µl de **Template buffer** (TAPÓN NEGRO), resuspender mediante vórtex y realizar un pulso de centrifugación
- 3) Pipetear 50 µl del **Positive Control (TAPÓN NARANJA)** en el tubo C3
- 4) Vórtex y pulso de centrifugación
- 5) Cambiar la punta y pipetear 50 µl del tubo C3 en el tubo C2
- 6) Vórtex y pulso de centrifugación
- 7) Repetir los pasos 5 y 6 con los tubos C2 a C1 para completar la dilución decimal seriada



Dilución decimal seriada		copias/µl	copias en 5 µl
Positive Control (TAPÓN NARANJA)		2×10^3	10^4
Tubo C3		2×10^2	10^3
Tubo C2		2×10	10^2
Tubo C1		2	10

MTplex qPCR

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.

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.

Reactivos	Volumen
DNase/RNase free water (TAPÓN VERDE)	9 µl
GPS™-mix (TAPÓN AZUL)	5 µl
TargetSpecies qPCR-mix (TUBO ÁMBAR)	1 µl
Volumen de la pre-mix de reacción	15 µl

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

Añadir 5 µl de muestra procesada 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 µl.

Reactivos	Volumen
Pre-mix de reacción dispensada	15 µl
Muestra procesada (o DNase/RNase free water) ¹	5 µl
VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN	20 µl

¹ 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. Los reactivos de GPS™ son compatibles con todos los termocicladores de PCR a tiempo real del mercado. El uso de un marcador pasivo como el ROX no es necesario.

Fast-Cycling	Paso	Tiempo	Temperatura
	Activación	2 min	95 °C
40 Ciclos	Desnaturalización	1 sec	95 °C
	Hibridación / Extensión y recolección de datos ^{1,2}	10 sec	60 °C

1 La señal de fluorescencia debe recogerse durante este paso usando el canal apropiado.

2 En los equipos que presenten limitaciones en los tiempos del paso de hibridación/elongación, se puede incrementar el tiempo a 30 segundos.

CONTROLES DE REACCIÓN RECOMENDADOS

Los siguientes controles de reacción de 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 extracción deben ser eliminados.

Control de Extracción Positivo (ExtCtrl +): Realizar una extracción de acuerdo con el protocolo de extracción añadiendo 5 µl del **Positive Control** (**TAPÓN NARANJA**), o del material genético 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 la intersección con el eje Y y la pendiente de la recta de calibrado (ecuación 1). El número de copias en la muestra se puede calcular basándonos en la regresión (ecuación 2).

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

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

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/ μl .

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	I C	ExtCtrl -	Interpretación
+	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	Reactivos de PCR contaminados
-	-	+ / -	+ / -	+ / -	Experimento fallido
-	+	+ / -	+ / -	+	Contaminación durante la extracción
-	+	-	+	-	Muestra negativa
-	+	+	+ / -	-	Muestra positiva
-	+	-	-	-	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.

EVALUACIÓN FUNCIONAMIENTO Y EVIDENCIA CLÍNICA

Sensibilidad analítica

Para la calibración y el análisis estadístico, el estudio de linealidad se realizó con seis rangos de una 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 con el eje Y y la Eficiencia.

El análisis de regresión lineal rindió un valor de coeficiente de correlación de **R² = 0.999** con una pendiente de -3.464 e Intersección con el eje Y de 37.616. La Eficiencia de la amplificación (E) se estimó usando la pendiente de las curvas 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 fue (**0.403**) 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. Se pueden detectar **10 copias** de la diana con un **100 %** 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*. Al menos hasta 10 copias de la diana pueden ser cuantificadas según los valores calculados a partir de 15 diluciones del molde. El valor *t_{value}* experimental obtenido de **0.003** es inferior al valor *t_{student}* de 2.145; validando el **LOQ** en **10 copias**.

Fiabilidad del análisis

La fiabilidad 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 del ensayo.

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. Los coeficientes de variación (CV) de la Repetibilidad y Reproducibilidad se detallan para cada nivel de la serie de diluciones.

Coeficiente de variación (CV)		
Copias	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 distinguirla de dianas similares. Para la inclusividad y exclusividad, se realizó una primera verificación *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). La inclusividad se verificó experimentalmente *in vitro*, por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), con el material genético de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis-BCG* y *M. caprae*. La exclusividad *in vitro* fue ensayada con extracto DNA de especies de micobacterias no tuberculosas, cedidos en relación a la colaboración con el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (VISAVET-UCM).

Evaluación clínica

Un total de 197 muestras fueron analizadas con el ensayo para calcular la Sensibilidad Diagnóstica (proporción de positivos correctamente identificados) y Especificidad Diagnóstica (proporción de negativos correctamente identificados). Del total de muestras, 71 fueron extractos DNA de muestras de linfonodos (respiratorios, pulmón y/o hígado) de origen bovino o caprino cedidos por la colaboración con el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (VISAVET-UCM), 80 muestras clínicas (esputos y lavados bronquiales) del Laboratorio de referencia Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), y 46 muestras clínicas (esputo, líquido de lavados bronquiales, material quirúrgico) obtenidas de pacientes con tuberculosis del Central Tuberculosis Research Institute of Russian Academy of Medical Sciences (CTRI).

MTplex qPCR		Técnica de referencia		
Muestras	126	Positivas	93	Negativos
Positivas	91	V. Positivos	91	F. Positivos
Negativas	35	F. Negativos	2	V. Negativos

La Sensibilidad Diagnóstica se evaluó con 93 muestras positivas, obteniéndose un valor de 98 % para todos los ensayos. La Especificidad Diagnóstica se evaluó con 33 muestras negativas, obteniéndose un valor de 100 %. La eficiencia Diagnóstica general fue de 98 %.

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, R² y eficiencia. Toda esta información está disponible en el **Quality Certification** proporcionado al cliente por GPS™.

REQUISITOS REGLAMENTARIOS

El producto cumple con lo dispuesto en el Real Decreto 1662/2000 (Directiva Europea 98/79/CE) por el que se regula 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. Para presupuestos, pedidos o diseños para nuevas dianas, por favor contacte 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

e-mail: info@geneticpcr.com

