



380236-C

Español

REF 972000

Loopamp™ MTBC Detection Kit

USO PREVISTO

Loopamp™ MTBC Detection Kit es una prueba cualitativa de diagnóstico *in vitro* para detectar el ADN del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) extraído del esputo en pacientes con síntomas indicativos de infección por MTBC. El kit sirve de ayuda en el diagnóstico de la infección por MTBC y está destinado a ser utilizado en laboratorios profesionales y hospitales por personal debidamente capacitado. El resultado puede interpretarse mediante un turbidímetro automático o visualmente bajo irradiación UV.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Este producto se basa en el método de amplificación de ácidos nucleicos LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle) desarrollado por Eiken Chemical Co., Ltd.

Las características del método de LAMP son las siguientes: (1) Solo necesita una enzima y la reacción de amplificación se produce en condiciones isotérmicas;^{1,2)} (2) tiene una especificidad extremadamente alta debido al uso de cuatro cebadores que reconocen seis regiones distintas en la diana; (3) tiene una alta eficiencia de amplificación y puede producir una alta concentración de producto amplificado en poco tiempo, lo que hace posible la detección visual o automatizada.^{3,4)}

Los cebadores proporcionados con este producto están diseñados en la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*) y la región de la secuencia de inserción (SI) IS6110 del ADN genómico del MTBC, que se ha confirmado mediante análisis de la alineación de las secuencias de bases seleccionadas del MTBC y micobacterias no tuberculosas que tienen una secuencia de bases bien conservada en el MTBC.

El ADN del esputo no tratado o del esputo tratado con NALC-NaOH se extrae utilizando el Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (se vende por separado). A continuación, la solución de ADN se dispensa en un tubo de reacción. A continuación, la ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la hebra, los desoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), la calceína, los tampones de reacción y los cebadores específicos para MTBC se conservan en forma seca en la tapa del tubo de reacción. Este reactivo LAMP seco (reactivo de detección de MTBC (dMTB)) se disuelve cuando se añade la solución de ADN. A continuación, el tubo de reacción se incuba a 67,0 °C y el ADN es amplificado mediante catálisis por la ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la hebra en la reacción de LAMP.

La detección de los productos amplificados se hace mediante determinación de la turbidez producida por un subproducto, el pirofosfato de magnesio (precipitado de color blanco).³⁾ Como alternativa, en lugar de mediante determinación de la turbidez, la detección se puede hacer a simple vista con radiación UV. Antes de la reacción, la calceína en el reactivo se encuentra en estado apagado debido a los iones de manganeso unidos a ella; sin embargo, una vez iniciada la reacción LAMP, se generan iones de pirofosfato que se unen a los iones de manganeso y la calceína se vuelve fluorescente.⁴⁾

CONTENIDO DEL KIT

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la etiqueta, suponiendo que el envase permanezca sin abrir a una temperatura de almacenamiento de 2–30 °C. También los reactivos son estables después de abrir el envase si se siguen estas instrucciones de procedimiento.

Reactivo de detección de MTBC..... 2 x 48 tubos

Cada uno de los tubos de reacción contiene los siguientes reactivos en forma seca:

ADN polimerasa de *Bst*¹
Desoxinucleótidos trifosfatos
Sulfato de magnesio
Calceína
Cloruro de manganeso
Cebadores²

Control positivo de MTB (PC MTB)³..... 1 x 0,4 mL

Control negativo de MTB (NC MTB)..... 3 x 0,5 mL
Cuentagotas de 30 µL..... 1 x 18 cuentagotas

*1: La ADN polimerasa de *Bst* obtenida a partir de *Bacillus stearothermophilus* es una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la hebra que carece de actividad exonucleasa en sentido 5'→3'.

*2: Cebadores diseñados en la *gyrB* y la región de la SI del ADN genómico de MTBC, purificados por HPLC a partir de oligonucleótidos sintéticos.

*3: El PC MTB contiene un producto resultante de la amplificación *in vitro* de un ADN genómico molde procedente de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (núm. de GenBank NC_000962).

Las abreviaturas de los siguientes reactivos y el n.º de lote, así como el fabricante (EKN), están impresos en los envases como se muestra a continuación:

Reactivos	Etiquetado en el tubo	Código en la tapa
Control positivo de MTB	PC MTB N.º de lote, EKN	PC MTB
Control negativo de MTB	NC MTB N.º de lote, EKN	NC MTB

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- Este producto está diseñado únicamente para el diagnóstico clínico de MTBC a partir de muestras de esputo de origen humano. No utilizar para otros fines.
- Siga siempre estas instrucciones de uso al utilizar este producto.
- No congele los reactivos.
- No utilice reactivos que hayan caducado.
- No mezcle lotes diferentes.
- No reponga ningún reactivo.
- La calidad de los resultados obtenidos con el Loopamp™ MTBC Detection Kit depende de la destreza del operador y del cumplimiento de las instrucciones del procedimiento. Las pruebas deben ser realizadas por personal debidamente cualificado siguiendo estrictamente las instrucciones proporcionadas.
- Por lo tanto, retire solo el número necesario de tubos de reacción del embalaje antes de utilizarlos y vuelva a sellar la bolsa de aluminio inmediatamente.
- No retire el desecante de la bolsa de aluminio. Un exceso de humedad puede deteriorar el reactivo seco de LAMP en los tubos de reacción.
- La exposición al calor, la humedad y la luz podría deteriorar el dMTB. Por lo tanto, retire sólo el número necesario de tubos de reacción (total de muestras y controles) y vuelva a sellar la bolsa de aluminio inmediatamente.
- Lea el manual de instrucciones y asegúrese de que los equipos necesarios (turbidímetro o incubadora) están disponibles antes de comenzar el procedimiento.
- Las muestras de esputo representan un riesgo de infección. Tome todas las medidas preventivas necesarias para evitar el riesgo biológico.⁵⁾
- El PC MTB y el NC MTB contienen una pequeña cantidad de azida sódica que actúa como conservante. Puesto que la azida sódica está clasificada como tóxica, evite todo contacto con los ojos, la boca o la piel.
- En caso de contacto accidental de cualquiera de los reactivos con los ojos, la boca o la piel, enjuague inmediatamente la zona afectada con agua abundante y, si es necesario, acuda al médico.
- No diluya ni añada PC MTB a las muestras. En su lugar, utilice el PC MTB sólo según se detalla en este manual para evitar la contaminación con ADN.
- Conserve el PC MTB y todas las muestras de esputo positivas por separado de los demás reactivos del kit.
- La tapa de cada uno de los tubos de reacción contiene dMTB en forma seca. No toque el interior de la tapa.
- Antes de utilizar los tubos de reacción, compruebe detenidamente si presentan grietas o arañazos. Los tubos dañados podrían dar resultados falsos y provocar la contaminación de la incubadora y del área de trabajo con ADN.
- No exponga los tubos de reacción a la luz UV antes de la

finalización de la reacción de LAMP. La exposición prolongada a la luz UV podría dañar los tubos y dar resultados falsos.

- (21) No mire directamente la luz UV cuando esta se utilice para la valoración de la fluorescencia a simple vista. Dado que la luz UV es perjudicial para la vista, incluso si se observa durante un breve periodo de tiempo, esta puede producir irritación ocular y síntomas similares a los de la conjuntivitis. Por lo tanto, utilice una pantalla de cristal, gafas de seguridad o una máscara ocular con protección UV siempre que mire directamente a la luz UV.
- (22) Consulte el manual de la incubadora. Cuando se utilice el HumaLoop T o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A, tenga cuidado al retirar los tubos de reacción de la incubadora para evitar quemaduras.

ELIMINACIÓN DE DESECHOS

- (1) No abra los tubos después de la amplificación del ADN. Deje la tapa cerrada y deseche los tubos usados con los residuos biológicos para su incineración o deséchelos mediante embolsado doble con bolsas de plástico sellables.
- (2) Nunca esterilice en el autoclave los tubos de reacción ni los reutilice, de lo contrario, los productos amplificados se dispersarán produciendo contaminación.
- (3) El material principal para los tubos de reacción y los tubos de reactivos es el PP; para la bandeja de los tubos de reacción, el PET; para la bolsa de aluminio, el aluminio; y para el estuche del kit, el papel.
- (4) Deseche todos los demás reactivos, el envase o el material de laboratorio usados de acuerdo con la normativa local.

RECOGIDA DE MUESTRAS

- (1) Utilice la parte más purulenta de la muestra de esputo.
- (2) Las muestras de esputo se deben utilizar inmediatamente después de su recogida.
- (3) La recogida de muestras de esputo se ha de hacer en una sala independiente de la sala de amplificación por LAMP. Durante la recogida de muestras de esputo se pueden generar aerosoles que contienen ADN de MTBC, lo que podría provocar contaminación.

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit
- Pipette-60 Set

Para la detección de fluorescencia a simple vista

(Para HumaLoop T)

- HumaLoop T

(Para otra incubadora con luz UV)

- Incubadora (precisión de la temperatura: $\pm 0,5$ °C; con cubierta caliente)
- HumaHeat u otro termobloque
- Luz UV o luz LED azul (longitud de onda: 240–260 nm y 350–370 nm)
- Gafas de seguridad o máscara ocular con protección UV (opcional)

Para la detección de la turbidez en tiempo real

- HumaTurb C+A
- HumaHeat u otro termobloque

Para la mezcla de reactivos y muestras

- Centrifuga para microtubos (opcional)
- Centrifuga para ocho tubos conectados (opcional)
- HuMax ITA, microcentrifuga (opcional)

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

(1) Reactivo de detección de MTBC

Retire el número necesario de tubos de la bolsa de aluminio y colóquelos en la gradilla. (total de muestras y controles).

Nota: Una vez haya retirado los tubos necesarios, vuelva a sellar la bolsa de aluminio inmediatamente con los tubos que no haya utilizado.

(2) Control negativo MTB (NC MTB)

Sacuda el tubo de arriba a abajo (o centrifúguelo) para recoger el contenido al fondo del tubo. Pipetee 60 μ L de NC MTB en el tubo de calentamiento suministrado en el Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit. Realice el tratamiento del NC MTB (en adelante, el NC MTB extraído se denominará «solución de control negativo») siguiendo las instrucciones.

Nota: Siempre se debe incluir un control negativo.

(3) Control positivo de MTB (PC MTB)

Sacuda el tubo de arriba a abajo (o centrifúguelo) para recoger el contenido al fondo del tubo.

Nota: El PC MTB se debe analizar siempre.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Extracción de ADN

Para extraer el ADN de la muestra de esputo de 60 μ L, siga las instrucciones del Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (se vende por separado). Dispense 60 μ L de la muestra de esputo en el tubo de calentamiento y colóquelo en el HumaHeat o en el termobloque precalentado a 90 °C. Utilice el esputo más purulento siempre que sea posible.

Mezcla de reactivos y muestras

(1) Encienda el HumaLoop T o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A.

(2) Dispense 30 μ L de la solución de la muestra en un tubo de reacción utilizando el Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit y cierre la tapa.

Nota: El volumen entre las dos líneas del tubo de reacción corresponde a aproximadamente 30 μ L.

(3) Dispense 30 μ L de la solución de control negativo en un tubo de reacción utilizando el Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit y cierre la tapa.

Nota: El volumen entre las dos líneas del tubo de reacción corresponde a aproximadamente 30 μ L.

(4) Dispense 30 μ L de PC MTB en un tubo de reacción utilizando el cuentagotas suministrado y cierre la tapa.

(5) Sacuda el tubo de arriba a abajo (o centrifúguelo) para recoger la solución al fondo de los tubos.

Nota: Asegúrese de que el nivel de líquido se encuentra en el centro de las dos líneas de un tubo de reacción para garantizar que se pipeteen 30 μ L.

(6) Reconstituya los reactivos secos en la tapa invirtiendo los tubos de reacción y recogiendo la solución de ADN en la tapa. Deje los tubos boca abajo durante 2 minutos para reconstituir los reactivos secos.

(7) Invierta los tubos de reacción cinco veces para mezclar el contenido. Asegúrese de que los reactivos secos en la tapa están completamente disueltos.

(8) Sacuda el tubo de arriba a abajo (o centrifúguelo) para recoger la solución al fondo de los tubos.

Amplificación

Para la detección de fluorescencia a simple vista

(Para HumaLoop T)

(1) Compruebe que la temperatura en el HumaLoop T es de 67,0 °C.

(2) Coloque los tubos de reacción en el HumaLoop T y pulse el botón verde para iniciar la reacción de LAMP (40 minutos a 67,0 °C). Consulte el manual de instrucciones del HumaLoop T para obtener información sobre el funcionamiento de la incubadora.

(3) Confirme la finalización de la inactivación de la polimerasa (completada automáticamente por el HumaLoop T). Retire todos los tubos de reacción del HumaLoop T.

(Para otra incubadora con luz UV)

(1) Fije la temperatura de la incubadora a 67,0 °C (con la temperatura del capó caliente fijada a 10 °C por encima de la temperatura de reacción o lo más cerca posible de esta cifra; exactitud de la temperatura: $\pm 0,5$ °C).

(2) Coloque los tubos de reacción y a continuación inicie la reacción de amplificación (durante 40 minutos a 67,0 °C).

(3) Después de 40 minutos, inactive la polimerasa utilizando el HumaHeat o el termobloque (durante 5 minutos a 80 °C o durante 2 minutos a 95 °C) para parar la reacción.

Para la detección de la turbidez en tiempo real con el HumaTurb C+A (véase el diagrama de flujo del procedimiento)

(1) Configure el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A para la detección con este producto.

(2) Compruebe si la temperatura mostrada en la pantalla alcanza los 67,0 °C (deje que el turbidímetro se caliente durante 20 minutos antes de utilizarlo).

(3) Coloque los tubos de reacción e inicie el análisis.

(4) Observe la pantalla del turbidímetro para comprobar si los controles positivo y negativo presentan un aumento de la turbidez. Si la turbidez aumenta en el control positivo, pero no en el control

negativo, la reacción de amplificación está teniendo lugar correctamente (Fig. 1). Si no es así, la reacción de amplificación podría estar teniendo lugar de manera incorrecta. Si este fuera el caso, vuelva a analizar las muestras afectadas.

- (5) Confirme la finalización de la inactivación de la polimerasa (completada automáticamente por el turbidímetro). Retire todos los tubos de reacción del turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A y deséchelos sin abrirlos.

Gráfico de amplificación

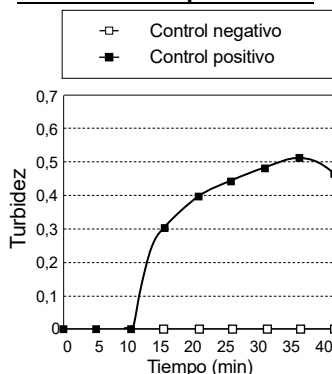


Fig. 1: Gráficas de amplificación correspondientes a los controles.

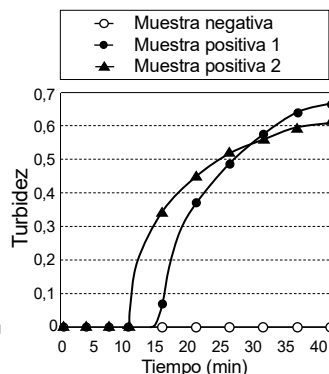


Fig. 2: Gráficas de amplificación correspondientes a las muestras.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

- (1) La reacción de LAMP es muy sensible, y cualquier contaminante, incluso con pequeñas cantidades de producto amplificado, podría dar falsos positivos.
- (2) Separe las zonas de recogida de muestras de esputo de la zona donde se realizan las pruebas de LAMP.
- (3) Antes y después de realizar la prueba, limpie las mesas de trabajo con una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de al menos un 0,5%.
- (4) Adopte todas las medidas necesarias para evitar la contaminación, en particular, cámbiese los guantes después de transferir el esputo o si los guantes entran en contacto con la solución de ADN.
- (5) Al manipular este producto, evite la contaminación con microbios y con nucleasas. Incluso una pequeña cantidad de desoxirribonucleasa transmitida por el sudor o la saliva al tubo de reacción podría descomponer el ADN y causar un resultado falso.
- (6) No utilice muestras de esputo que contengan una gran cantidad de sangre, ya que esto puede afectar a las determinaciones. Consulte el «Manual de Microbiología Clínica, 12ª edición»⁶⁾ si tuviera que realizar un pretratamiento de la muestra.
- (7) Lo ideal es que la solución de ADN se utilice inmediatamente después de su preparación; si es imposible, la solución de ADN puede almacenarse a temperatura ambiente y utilizarse en un plazo de 72 horas.
- (8) Al dispensar la solución en el tubo de reacción, evite el contacto entre la tapa de inyección del Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit y la pared interior de los tubos de reacción. Mantenga la gradilla del tubo en posición vertical y llene el tubo hasta que el nivel de la solución de ADN esté entre las dos líneas (30 µL). De no hacer esto correctamente (por encima de la línea superior o por debajo de la línea inferior), la calidad de los resultados se podría ver afectada.
- (9) **(Para HumaLoop T o cualquier otra incubadora con luz UV)**
Si hubiera burbujas, sacuda los tubos de arriba a abajo (o centrifúgelos) para eliminarlas.
(Para el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A)
Puesto que las burbujas en la solución de reacción interfieren con la determinación de la turbidez y producen resultados falsos, evite la formación de burbujas al mezclar el reactivo y la solución problema. Si hubiera burbujas, sacuda los tubos de arriba a abajo o centrifúgelos para eliminarlas.
- (10) El dMTB debe estar completamente disuelto. Toda porción no disuelta podría afectar a la calidad de los resultados, por ejemplo, causando una disminución de la sensibilidad. En particular, mantenga los tubos en posición invertida durante 2 minutos.
- (11) El PC MTB contiene un elevado número de copias de ADN de control. Evite la contaminación de otras muestras con el PC MTB. Dispense las muestras y la solución de control negativo y cierre

todos los tubos de reacción antes de dispensar el PC MTB.

- (12) Sacuda el tubo de PC MTB de arriba a abajo (o centrifúguelo) antes de utilizarlo, para recoger el contenido al fondo del tubo. Cierre el tubo inmediatamente después de dispensar el PC MTB.
- (13) Cuando se utiliza el HumaLoop T o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A, la inactivación de la polimerasa se realiza automáticamente.
- (14) Para otras incubadoras, cuando se seleccione como criterio la fluorescencia a simple vista, inactive la polimerasa (durante 5 minutos a 80 °C o durante 2 minutos a 95 °C) antes de hacer la lectura, o de lo contrario se generarán resultados falsos.
- (15) Para otras incubadoras, cuando la detección se hace por luz UV, no la mire directamente. En su lugar, utilice una pantalla de cristal, gafas de seguridad o una máscara ocular con protección UV siempre que mire directamente a la luz UV.
- (16) Nunca abra los tubos de reacción una vez iniciada la reacción de LAMP o después de terminada. Tenga especial cuidado al retirar los tubos de reacción de la incubadora para evitar abrirlos de manera accidental.
- (17) No reutilice ningún producto amplificado en los tubos para electroforesis u otras aplicaciones.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para la detección de fluorescencia a simple vista

(Para HumaLoop T)

Coloque cada uno de los tubos de reacción en la unidad de detección de fluorescencia, y a continuación irradie y observe el tubo desde un lado.

(Para otra incubadora con luz UV)

Irradie el fondo de cada uno de los tubos de reacción y observe desde un lado a través de gafas de seguridad o de una máscara ocular con protección UV.

Para que la tanda analítica sea válida, se deben obtener los siguientes resultados:

- Control positivo: se emite luz fluorescente verde
- Control negativo: no se emite luz fluorescente

Si algún control es inválido, todas las muestras de la corrida deben reportarse como inválidas y la prueba debe repetirse.

Una vez se haya confirmado que la tanda analítica es válida, evalúe las muestras de la siguiente manera:

- Muestra positiva: se emite luz fluorescente verde.
- Muestra negativa: no se emite luz fluorescente.

Para la detección de la turbidez en tiempo real con HumaTurb C+A

Una vez se haya confirmado que la turbidez aumenta en el control positivo, pero no en el control negativo, evalúe las muestras atendiendo a los siguientes criterios (Figs. 1 y 2).

- Positivo: se observa un cierto aumento de la turbidez.
- Negativo: no se observa un aumento de la turbidez.

Notas:

- (1) La sensibilidad mínima detectable de este producto es de 0,38 equivalentes genómicos por prueba. Incluso con una prueba negativa, los pacientes con cualquier síntoma persistente indicativo de una infección por MTBC deben hacerse otra prueba.
- (2) Aunque los cebadores se han diseñado para dirigirse a una región que contenga un número relativamente pequeño de variaciones, es posible que el MTBC adquiera variaciones adicionales en esta región y se vuelva menos sensible a este producto. Por lo tanto, que una prueba haya dado negativo no siempre permite descartar la infección por MTBC.
- (3) Los resultados analíticos se pueden ver afectados por la recogida y el transporte de las muestras, la preparación de las muestras, los inhibidores y otros errores del procedimiento en el laboratorio. Una prueba que haya dado negativo no permite descartar la presencia de MTBC en la muestra. Al hacer un diagnóstico clínico, hay que tener en cuenta el estado clínico del paciente y todos los demás resultados analíticos disponibles.
- (4) Este producto es un kit para la detección cualitativa; no está diseñado para la determinación cuantitativa. Por lo tanto, la intensidad de la luz fluorescente observada o el tiempo de aumento de la turbidez determinado por el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A no guarda relación con la concentración de ADN molde.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Estudios internos revelaron que la medición no se ve afectada por la presencia de bilirrubina libre (91,0 mg/dL), bilirrubina conjugada (101,0 mg/dL), quilo (turbidez de formazina: 7.300) y hemoglobina hemolítica (2.475 mg/dL).

En cuanto a los fármacos, nuestros estudios internos han revelado que la medición no se ve afectada por la presencia de isoniazida (100 µg/mL), etambutol (20 µg/mL), rifampicina (100 µg/mL), pirazinamida (500 µg/mL), kanamicina (20 µg/mL), y estreptomycin (500 µg/mL).

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

1. Precisión

En los análisis de las siguientes muestras:

- muestra negativa (concentración: 0 equivalentes genómicos/prueba)
- muestra positiva 1 (1,875 equivalentes genómicos/prueba)
- muestra positiva 2 (125 equivalentes genómicos/prueba)

La muestra negativa debe dar negativo, mientras que las muestras positivas 1 y 2 deben dar positivo.

2. Reproducibilidad intraserie

Si se analizan simultáneamente cinco muestras negativas y cinco positivas, las muestras negativas deben dar siempre negativo, mientras que las muestras positivas deben dar siempre positivo.

3. Límite de detección

0,38 genomas equivalentes/prueba

4. Reactividad cruzada

En cuanto a las micobacterias no tuberculosas (*Mycobacterium asiaticum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium malmoeense*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium flavescens*) (1,0 x 10⁴ genomas equivalentes por prueba) y bacterias de enfermedades respiratorias (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma pneumoniae* (I), *Mycoplasma pneumoniae* (II)) (1,0 x 10⁵ genomas equivalentes por prueba), el sistema de medición dio resultados negativos para todas las especies bacterianas; no se produjo ninguna reacción cruzada.

5. Reactividad frente a MTBC

Se confirmó la reactividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*.

6. Información sobre un calibrador

En la evaluación de los parámetros de calidad de este producto se utilizó el ADN plásmidico que contiene el *gyrB* y la región SI del ADN del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (núm. de GenBank NC_000962) como calibrador.

7. Rendimiento clínico

Hasta la fecha, la tuberculosis sigue siendo una de las infecciones más importantes del mundo. A nivel mundial, el número total estimado de nuevos casos de tuberculosis es de unos 10 millones, y el de esputo con baciloscopia positiva es de unos 4,3 millones.⁷⁾ En Japón, en 2008 se registraron 24.760 nuevos pacientes afectados por la tuberculosis, de los cuales 2.216 fallecieron.⁸⁾

A fin de comprobar la eficiencia en el diagnóstico de pacientes que podrían tener tuberculosis, este producto se examinó en dos centros médicos designados para enfermedades infecciosas de clase 2 (centros médicos designados que tenían camas exclusivas para pacientes con tuberculosis). Junto con la PCR y TRC, ambos ya aprobados en Japón, este kit se utilizó para analizar muestras de esputo recogidas durante 2 días (320 muestras de 160 sujetos), y se compararon los resultados obtenidos con cada kit. En particular, las pruebas realizadas con este producto incluían evaluaciones de la solución de ADN extraído de esputo no tratado (en adelante, LAMP para esputo no tratado) y de la solución de ADN extraído de esputo pretratado con NALC-NaOH y algún otro proceso (en adelante, LAMP para esputo pretratado).

Como se muestra en las tablas siguientes, la tasa de concordancia global fue favorable, como se indica a continuación: LAMP para esputo no tratado frente a PCR: 91,5% (291/318 sujetos); LAMP para esputo pretratado frente a PCR: 92,1% (293/318); LAMP para esputo no tratado frente a TRC: 94,3%

(230/244); LAMP para esputo pretratado frente a TRC: 93,0% (227/244). Además, las evaluaciones realizadas mediante detección de la turbidez en tiempo real y detección de la fluorescencia a simple vista concordaban perfectamente, excepto para una muestra (esta muestra era esputo sanguinolento y dio un falso negativo en la detección de la fluorescencia a simple vista debido a la alteración producida por la sangre). Por lo tanto, consideramos que los dos tipos de evaluaciones son idénticas. Las tablas a continuación muestran los resultados obtenidos mediante detección de la turbidez en tiempo real. Cabe destacar que los resultados obtenidos mediante detección de la fluorescencia a simple vista por el HumaLoop T fueron los mismos que los obtenidos mediante el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A.

LAMP		PCR	
		Positivo	Negativo
Esputo no tratado	Positivo	196	7
	Negativo	20	95
Tasa de concordancia global		91,5% (291/318)	
Sensibilidad diagnóstica		90,7% (196/216)	
Especificidad diagnóstica		93,1% (95/102)	
Valor predictivo positivo		96,6% (196/203)	
Valor predictivo negativo		82,6% (95/115)	
Coeficiente de probabilidad + (sensibilidad/(1-especificidad))		13,1	
Coeficiente de probabilidad - ((1-sensibilidad)/especificidad)		0,0999	
LAMP		PCR	
		Positivo	Negativo
Esputo pretratado	Positivo	194	3
	Negativo	22	99
Tasa de concordancia global		92,1% (293/318)	
Sensibilidad diagnóstica		89,8% (194/216)	
Especificidad diagnóstica		97,1% (99/102)	
Valor predictivo positivo		98,5% (194/197)	
Valor predictivo negativo		81,8% (99/121)	
Coeficiente de probabilidad + (sensibilidad/(1-especificidad))		31,0	
Coeficiente de probabilidad - ((1-sensibilidad)/especificidad)		0,105	

LAMP		TRC	
		Positivo	Negativo
Esputo no tratado	Positivo	163	5
	Negativo	9	67
Tasa de concordancia global		94,3% (230/244)	
Sensibilidad diagnóstica		94,8% (163/172)	
Especificidad diagnóstica		93,1% (67/72)	
Valor predictivo positivo		97,0% (163/168)	
Valor predictivo negativo		88,2% (67/76)	
Coeficiente de probabilidad + (sensibilidad/(1-especificidad))		13,9	
Coeficiente de probabilidad - ((1-sensibilidad)/especificidad)		0,0451	
LAMP		TRC	
		Positivo	Negativo
Esputo pretratado	Positivo	157	2
	Negativo	15	70
Tasa de concordancia global		93,0% (227/244)	
Sensibilidad diagnóstica		91,3% (157/172)	
Especificidad diagnóstica		97,2% (70/72)	
Valor predictivo positivo		98,7% (157/159)	
Valor predictivo negativo		82,4% (70/85)	
Coeficiente de probabilidad + (sensibilidad/(1-especificidad))		32,6	
Coeficiente de probabilidad - ((1-sensibilidad)/especificidad)		0,0895	

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Código del producto	Nombre del producto	Índice
972000	Loopamp™ MTBC Detection Kit	96 pruebas
980000	HuMax ITA	Microcentrifuga
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 pruebas
964000	HumaHeat Incubator	Termobloque
971000	Pipette-60 Set	1 pipeta, 4 x 96 puntas
961000	HumaLoop T	1 unidad principal 1 unidad de detección de fluorescencia
963200	HumaTurb C+A	1 unidad de control 1 unidad de amplificación

AVISO

En caso de producirse cualquier incidente grave relacionado con el producto, notifique al representante autorizado, al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

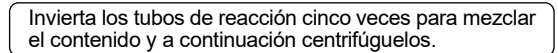
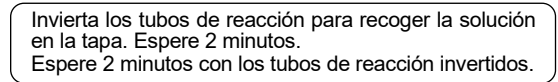
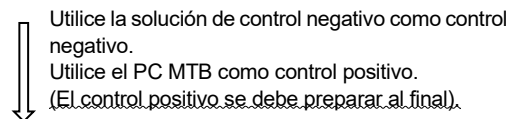
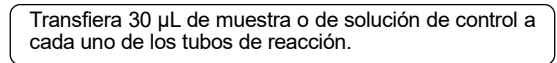
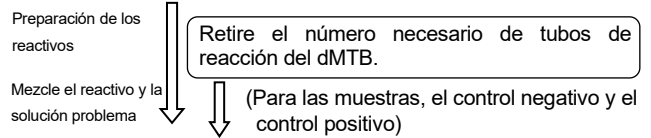
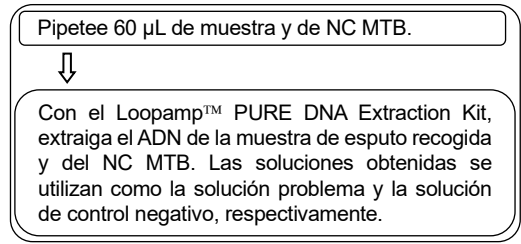
REFERENCIAS

- 1) Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research 28, No. 12, e63 (2000)
- 2) Nagamine K., et al.: Clin. Chem. 47, No. 9, 1742–1743 (2001)
- 3) Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, No. 1, 150–154 (2001)
- 4) Tomita N., et al.: Nat. Protoc. 3, No. 5, 877–882 (2008)
- 5) The guideline for the bio-safety and bio-hazard (by the Japanese Society for Bacteriology): Japanese Journal of Bacteriology 54, No. 3, 667–715 (1999)
- 6) Isabella MGaby EP and Nicole P., et al.: Manual of Clinical Microbiology, 12th edition, ASM PRESS, 558–575 (2019)
- 7) WHO global TB database:
<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/data>
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>
- 8) Kekkaku No Tokei 2009 (Statistics of TB 2009): Japan Anti-Tuberculosis Association

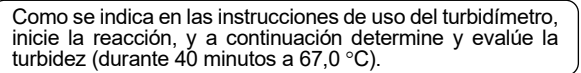
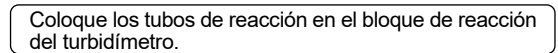
Diagrama de flujo

Procedimiento para detección de turbidez en tiempo real

Preparación de la solución de la muestra y de la solución de control negativo



Amplificación ↓ (Evite la formación de burbujas).



Confirme la finalización de la inactivación de la polimerasa (durante 5 minutos a 80 °C o durante 2 minutos a 95 °C). Retire todos los tubos de reacción del turbidímetro y deséchelos sin abrirlos. Tenga cuidado de no dañar los tubos.

TABLA DE SÍMBOLOS

REF	Número de catálogo	Consulte las instrucciones de uso	Fecha de caducidad
IVD	Diagnóstico in vitro dispositivo médico	Fabricante	Límite de temperatura
LOT	Código del lote	Contenido suficiente para <n> pruebas	Representante autorizado en la Comunidad Europea



Importador



HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

Max-Planck-Ring 21, 65205 Wiesbaden, Germany



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

4-19-9 Taito, Taito-ku, Tokyo, 110-8408 JAPAN

<https://www.eiken.co.jp/en>

Fecha de publicación: 8 de septiembre de 2022.