

**TEST AMPLIFIED PARA LA DETECCION DIRECTA DEL COMPLEJO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Equipo de 50 tests
(bioMérieux ref. 39006/Hologic Cat. No. 301001)

UTILIZACION 2

ADVERTENCIAS 2

PRECAUCIONES DE UTILIZACION 2

INTRODUCCION..... 4

PRINCIPIO 5

REACTIVOS (Equipo de 50 tests) 5

CONSERVACION 6

**TOMA DE MUESTRAS, CONSERVACION, TRANSPORTE Y TRATAMIENTO
DE LAS MUESTRAS..... 7**

 Toma y conservación de las muestras 7

 Transporte..... 7

 Tratamiento (descontaminación y concentración)..... 7

 Conservación de las muestras tratadas 7

MATERIAL 7

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO 9

 Controle..... 9

 Preparación del material..... 11

 Preparación del reactivo..... 12

 Preparación de las muestras..... 12

 Lisis de las muestras 13

 Amplificación..... 13

 Hibridación..... 14

 Selección..... 15

 Detección 15

 Repetición del test..... 15

OBSERVACIONES 16

INTERPRETACION DEL ENSAYO..... 17

PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS 17

LIMITES 18

VALORES ESPERADOS..... 19

RESULTADOS 20

RESOLUTION DE INCIDENTES..... 24

NOTAS 25

BIBLIOGRAFIA..... 26

UTILIZACION

El test AMPLIFIED PARA LA DETECCION DIRECTA DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (MTD) es un test que utiliza una sonda de ácido nucleico dirigida contra una diana amplificada, que permite la detección *in vitro* de los ácidos nucleicos de las micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Este test es realizado a partir de muestras procedentes de esputos (inducidos o expectorados), de muestras bronquiales (lavados bronco-alveolares o aspirados bronquiales) o de aspiraciones traqueales.

ADVERTENCIAS

La eficacia de este test no ha sido aún demostrada para la detección directa del RNAr de *M. tuberculosis* a partir de otras muestras clínicas (sanguíneas, urinarias o coprológicas, por ejemplo). Los rendimientos del test MTD han sido estudiados exclusivamente en muestras tratadas según la técnica descrita, y conservadas durante el tiempo y a las temperaturas especificadas en la presente ficha técnica.

Las muestras que den resultados positivos deben ser cultivadas para determinar la eventual presencia de otras micobacterias, además de las del complejo *M. tuberculosis* o de micobacterias atípicas. También deben realizarse tests de sensibilidad frente a los agentes anti-micobacterianos. Deben realizarse cultivos para detectar bacilos ácido-alcohol-resistentes (BAAR) con el fin de precisar qué subespecie del complejo *M. tuberculosis* (*M. bovis*, por ejemplo) se encuentra presente.

Durante los ensayos clínicos, se han analizado muestras realizadas en niños, en pacientes HIV-positivos y en pacientes contagiados con micobacterias atípicas. Sin embargo, el número de ensayos no ha permitido comparar estadísticamente los rendimientos del test en estos diferentes grupos.

No han sido evaluados los resultados del test en muestras procedentes de pacientes bajo tratamiento antituberculoso, con el fin de realizar un seguimiento terapéutico o de confirmar una mejoría.

Las muestras con elevada concentración sanguínea no deben ser analizadas con el equipo MTD.

PRECAUCIONES DE UTILIZACION

- A. Utilización reservada para el diagnóstico *in vitro*.
- B. El test MTD está destinado específicamente a las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, es decir, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, y *M. canetti*, pero no diferencia estas especies entre sí. *M. celatum* y *M. pseudo-terrae* pueden provocar reacciones cruzadas si se encuentran presentes en concentraciones superiores a 30 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por test. Sin embargo, *M. celatum* y *M. pseudo-terrae* son rara vez aislados en clínica.
- C. Un resultado negativo no excluye la presencia de una micobacteria del complejo *M. tuberculosis* en la muestra. La calidad de los resultados depende de la calidad de la muestra y de su transporte, de la variabilidad de la toma de muestras, de los errores

técnicos del laboratorio, de los errores de identificación de las muestras y de los errores en la transcripción de los resultados.

- D. El test se encuentra destinado sólo a la detección de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* a partir de muestras preparadas según los métodos NALC-NaOH o NaOH, recomendados por los Centros para el Control de Enfermedades (CDC)⁷. Este test debe ser utilizado sólo en muestras concentradas preparadas a partir de esputos (inducidos o expectorados), de aspirados traqueales o de muestras bronquiales (lavados bronco-alveolares o aspiraciones bronquiales). Durante la puesta en suspensión de la muestra en la solución de tampón fosfato, verificar que la concentración de fosfato sea de 67 mM⁷.
- E. Evitar cualquier contacto de los Reactivos de Detección I y II (bioMérieux ref. 39300 / Hologic Cat. No. 201791) con la piel, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, enjuagar con agua. Si estos reactivos se derraman, diluirlos con agua antes de secarlos.
- F. Adoptar las precauciones habituales durante la realización de este test⁴. La preparación de las muestras digeridas y descontaminadas, así como las etapas del test MTD, deben ser realizadas respetando las reglas de seguridad microbiológica de nivel 2⁵.
- G. Utilizar sólo el material suministrado o material de laboratorio de un solo uso.
- H. Las superficies de trabajo, las pipetas y el material deben ser descontaminados con una solución de lejía diluida al 1/2 (mitad de lejía, mitad de agua), como se describe en el párrafo « TECNICA ». Dejar la lejía en contacto durante 15 minutos y después enjuagar con agua y secar para eliminar los restos de lejía.
- I. Para realizar este test deben utilizarse pipetas con desplazamiento positivo o pipetas con desplazamiento de aire equipadas de puntas provistas de filtro. Durante la transferencia del lisado desde los tubos de lisis a los tubos de amplificación, deben utilizarse puntas extra largas. Cambiar de punta entre una etapa y otra. Evitar pasar por encima de otros tubos de la gradilla. Las puntas ya utilizadas deben ser desechadas de inmediato en un recipiente destinado a los desechos biológicos.
- J. Al utilizar una pipeta de repetición para la distribución de los reactivos, después de introducir el lisado en los tubos, evitar tocar el tubo con la punta de la pipeta con el fin de reducir los riesgos de contaminación entre los tubos. Los reactivos deben ser distribuidos contra la pared del tubo con el fin de evitar salpicaduras. Ser cuidadoso en la distribución de los reactivos reduce los riesgos de contaminación cruzada.
- K. No volver a utilizar las mismas pipetas en las etapas anteriores a la amplificación y en las etapas que siguen a la amplificación.
- L. Después de la lectura de los resultados utilizando un luminómetro, descontaminar los tubos y desecharlos como se ha descrito en los párrafos « TECNICA » y « OBSERVACIONES » con el fin de evitar la contaminación del laboratorio por los amplicones.
- M. JAMAS volver a utilizar las hojas autoadhesivas y los tapones utilizados durante la etapa precedente. Los tapones deben ser desechados en un recipiente apropiado,

inmediatamente después de haberlos retirado, para evitar cualquier contaminación cruzada. Las hojas autoadhesivas deben ser firmemente aplicadas en la parte alta de los tubos de reactivos.

- N. No cubrir el baño maría durante la incubación, en particular si se utilizan tapones (la condensación en la tapa puede ser una fuente de contaminación).
- O. Una buena homogeneización con un Vortex es necesaria después de añadir el Reactivo de Selección con el fin de obtener resultados precisos.
- P. Se recomienda elegir un lugar para la fase HPA (Hybridization Protection Assay) con vistas a minimizar la contaminación por amplicons. Este lugar debe ser diferente de aquél donde se realicen las preparaciones de las muestras, los reactivos y la etapa de amplificación.
- Q. Para prevenir las contaminaciones por amplicons en el laboratorio, el proceso deberá organizarse mediante un flujo de trabajo unidireccional. Por ejemplo, proceder a la preparación de las muestras y los reactivos, después la fase de amplificación para, finalmente, realizar la etapa HPA. Las muestras, el equipo y los reactivos nunca deberían retornar al área donde se han llevado a cabo los procesos anteriores. El personal no deberá volver a dichas áreas de trabajo sin haber tomado precauciones anticontaminación. Se recomienda firmemente que la cabina de bioseguridad empleada para el procesamiento de muestras no se reutilice para los ensayos MTD.

INTRODUCCION

El test MTD utiliza los métodos TMA (Transcription-Mediated Amplification) y HPA (Hybridization Protection Ensayo)² para detectar cualitativamente el RNA ribosómico (RNAr) de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. El test MTD detecta el RNA de los organismos cultivables y no cultivables. El complejo *M. tuberculosis* incluye las subespecies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, y *M. canetti* (12, 13). El test MTD detecta todos los microorganismos del complejo *M. tuberculosis*. Sin embargo, *M. microti* infecta solamente a los animales, *M. bovis* se transmite rara vez desde los animales infectados al hombre, mientras que *M. africanum*, es responsable de la tuberculosis pulmonar en Africa Tropical¹². *M. tuberculosis* es con mucho el miembro más común, responsable de importante morbilidad en el mundo entero. El CDC ha dado a conocer recientemente un aumento de los casos de tuberculosis en los pacientes afectados de SIDA y en los inmigrantes, y un aumento de la transmisión de la enfermedad en la población de alto riesgo^{6,9}. Se observa además el aumento del número de cepas resistentes e incluso multirresistentes a los agentes antituberculosos¹¹. Las consecuencias son considerables en el ámbito de la salud pública.

Los métodos de cultivo convencionales permiten observar el crecimiento de *M. tuberculosis* en un plazo de 1 a 8 semanas^{7,10}. El test MTD, por su parte, permite la detección del RNAr de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* en 2,5 a 3,5 horas. A pesar de que no permite realizar antibiogramas, el test MTD detecta *M. tuberculosis* de manera fiable y rápida. Esto permite utilizar mejor los servicios de aislamiento en los hospitales, iniciar rápidamente un tratamiento apropiado y prevenir la propagación de la enfermedad gracias a la identificación precoz y al aislamiento de los individuos contaminados³.

PRINCIPIO

El test MTD es un test en dos fases (amplificación y detección), que son realizadas en un mismo tubo. En primer lugar, la sonicación provoca la liberación de los ácidos nucleicos de las micobacterias. El calor es utilizado para desnaturalizar estos ácidos nucleicos y romper la estructura secundaria del RNAr. El método de amplificación Hologic TMA amplifica a continuación una diana específica del RNAr micobacteriano a través de un intermediario del DNA a una temperatura constante de 42°C. Se producen así múltiples copias del RNAr micobacteriano (amplicones).

Las secuencias del amplicon del RNAr, específicas a las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, son a continuación detectadas gracias al método de hibridación de ácidos nucleicos HPA². El Reactivo de Hibridación del test MTD contiene una sonda DNA monocatenaria conjugada con un marcador quimioluminiscente. Esta sonda es complementaria de las secuencias de RNA específicas de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. La sonda forma, con estas secuencias específicas, híbridos estables RNA-DNA. Después de la etapa de selección, la señal luminosa emitida por las sondas hibridadas es medida con el luminómetro de Leader™.

REACTIVOS (Equipo de 50 tests)

Nota: Para obtener información sobre cualquier aviso de riesgo o precaución que pueda estar asociado a los reactivos, consulte la Biblioteca de hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet Library) en www.hologic.com/sds.

Los reactivos para el test MTD son suministrados como sigue:

BANDEJA DE REACTIVOS PARA LA AMPLIFICACION

Nombre del reactivo	Volumen
Tampón de Dilución de las Muestras (SDB) <i>Solución tampón Tris que contiene < 3 % de detergente</i>	1 x 2,5 ml
Reactivo de Amplificación (A) <i>Acidos nucleicos liofilizados en una solución tampón Tris que contiene 5 % de agente ligante</i>	1 x 3 ml (después de la reconstitución)
Tampón de amplificación (AB) <i>Solution aqueuse contenant des conservateurs</i>	1 x 3 ml
Reactivo de amplificación oleoso (aceite para reacción de amplificación) (O) <i>Aceite de silicona</i>	1 x 10 ml
Reactivo Enzimático (E) <i>Transcriptasa inversa y RNA polimerasa liofilizadas en una solución tampón HEPES que contiene < 10 % de agente ligante y ≥ 15 mM de N-Acetil-L-cisteína</i>	1 x 1,5 ml (después de la reconstitución)
Tampón de Dilución Enzimático (tampón de dilución de las enzimas) (EDB) <i>Solución tampón Tris que contiene un surfactante y glicerol</i>	1 x 1,5 ml

BANDEJA DE LOS REACTIVOS PARA HIBRIDACION

Nom du réactif	Volume
Reactivo de Hibridación (H) <i>< 100 ng/frasco de sonda DNA no infecciosa conjugada con un marcador quimioluminiscente, liofilizada, en una solución de tampón succinato que contiene un agente ligante y un detergente</i>	1 x 6 ml (después de la reconstitución)
Tampón de Hibridación (HB) <i>Solución de tampón succinato que contiene < 4 % de detergente</i>	1 x 6 ml
Reactivo de Selección (S) <i>Solución de tampón borato que contiene un surfactante</i>	1 x 15 ml
Tubos de Lisis (LT) <i>Bolas de vidrio, agente ligante</i>	2 x 25 tubos

CONSERVACION

A. Las soluciones o los componentes no reconstituidos siguientes deben ser conservados a 2°C - 8°C y son utilizables hasta la fecha de caducidad indicada:

- Tampón de Dilución de las Muestras (SDB)
- Reactivo de Amplificación (A)
- Tampón de Amplificación (AB)
- Reactivo Enzimático (E)
- Tampón de Dilución Enzimático (EDB)
- Reactivo de Hibridación (H)

El Reactivo de Amplificación reconstituido (A) es utilizable durante 2 meses si se le conserva a 2°C - 8°C. El Reactivo de Hibridación (H) y el Reactivo Enzimático (E) son utilizables un mes a 2°C - 8°C después de la reconstitución, o dos meses a una temperatura igual o inferior a -20°C si son distribuidos en alícuotas y congelados el día de su reconstitución. Las fracciones alícuotas congeladas deben ser utilizadas el día en que son descongeladas. No utilizar congeladores con descongelación automática.

B. Los siguientes componentes deben ser conservados entre 2°C y 25°C y son utilizables hasta la fecha de caducidad indicada:

- Reactivo de Amplificación Oleosa (O)
- Tampón de Hibridación (HB)
- Reactivo de Selección (S)
- Tubos de Lisis (LT)

TOMA DE MUESTRAS, CONSERVACION, TRANSPORTE Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Toma y conservación de las muestras

Las muestras deben ser colocadas en recipientes estériles de plástico y conservadas a 2°C - 8°C antes de su transporte y tratamiento. Durante los ensayos clínicos, las muestras han estado almacenadas menos de 4 días (en general, menos de 24 horas) antes de su tratamiento.

Transporte

Transportar las muestras al laboratorio lo más rápidamente posible, conforme a la reglamentación vigente.

Tratamiento (descontaminación y concentración)

Las muestras con una fuerte concentración sanguínea no deben ser sometidas al test MTD. Este test ha sido diseñado para detectar el RNAr de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* utilizando muestras preparadas según los métodos de descontaminación NALC-NaOH o NaOH, utilizando 1% a 1,5% de NaOH durante 15 a 20 minutos y una centrifugación a una velocidad superior o igual a $\geq 3.000 \text{ g}^7$.

Conservación de las muestras tratadas

Las muestras pueden ser conservadas como máximo durante 3 días a 2°C - 8°C antes del test. Pueden también ser conservadas entre -20°C y -70°C durante 6 meses como máximo. No utilizar congeladores con descongelación automática.

MATERIAL

A. Material suministrado

BANDEJA DE REACTIVOS PARA AMPLIFICACION

Composición del equipo (<i>bioMérieux ref. 39006 / Hologic Cat. No. 301001</i>)	50 Tests
Tampón de Dilución de las Muestras (SDB)	1 x 2,5 ml
Reactivo de Amplificación (A)	1 x 3 ml (después de su reconstitución)
Tampón de Reconstitución (AB)	1 x 3 ml
Reactivo oleoso (aceite para reacción de amplificación) (O)	1 x 10 ml
Reactivo Enzimático (E)	1 x 1,5 ml (después de su reconstitución)
Tampón de Dilución Enzimática (EDB)	1 x 1,5 ml

BANDEJA DE REACTIVOS PARA HIBRIDACION

Composition du coffret (bioMérieux réf. 39006 / Hologic Cat. No. 301001F)	50 Tests
Reactivo de Hibridación (H)	1 x 6 ml (después de su reconstitución)
Tampón de Hibridación (HB)	1 x 6 ml
Reactivo de Selección (S)	1 x 15 ml
Tubos de Lisis (LT)	2 x 25 tubos
Tarjetas de protección (hojas autoadhesivas)	1 paquete

B. Material necesario no suministrado:

- Micropipetas capaces de distribuir 25 µl, 50µl, 100µl, 200µl, 300µl y 450µl
- Vortex
- Agua estéril (filtrada o sometida a autoclave)
- Tubos de cultivo
- Bolas de vidrio estériles de 3 mm
- Tubos para microcentrifugadora con tapones de rosca
- Portatubos para tubos de reactivos
- Puntas de pipeta provistas de filtro (1,000 µl)
- Controles Positivos de Amplificación (p. ej., *M. tuberculosis*, ATCC 25177 o ATCC 27294)
- Controles Negativos de Amplificación (p. ej., *M. gordonae*, ATCC 14470 o *M. terrae*, ATCC 15755)
- Lejía (solución de hipoclorito al 5,25%)
- Hojas de protección de superficies de trabajo, plastificadas
- Pipetas repetitivas

C. Material suplementario disponible en su distribuidor Hologic:

	<u>Cat. No.</u>
Sonicador (<i>bioMérieux ref. 39409</i>)	901104
Bloques calefactores (42°C ± 1°C, 60°C ± 1°C, 95°C ± 5°C) ^A (<i>bioMérieux ref. 39405, 39406, 39407</i>)	105524, 105524F, 105524J
Luminómetro Leader 50i (<i>bioMérieux ref. 39400</i>)	103100i
Equipo de Reactivos de Detección (<i>bioMérieux ref. 39300</i>)	201791
MTD Testigos de Amplificación (<i>bioMérieux ref. 39223</i> /Cat. No. 301043F) (<i>bioMérieux ref. 39223</i>)	301043F
Portatubos para el sonicador (<i>bioMérieux ref. 39313</i>)	104027
Portatubos para tubos de reactivos (<i>bioMérieux ref. 39311</i>)	104769
Puntas de pipeta largas provistas de filtro (1250 µl) (<i>bioMérieux ref. 39315</i>)	104316
Tubos de polipropileno, 12 x 75 mm (<i>bioMérieux ref. 39308</i>)	102440
Tapones de polipropileno para tubos de 12 x 75 mm (<i>bioMérieux ref. 39320</i>)	400713

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO**Controle**

Las cepas usadas como Testigos Positivos de Amplificación deberían pertenecer al complejo *M. tuberculosis* tales como el H37Ra (ATCC 25177) no virulento o el H37Rv (ATCC 27294) virulento. Las cepas usadas como Testigos Negativos deberían ser tipo MOTT, tales como *M. goodii* (ATCC 14470) o *M. terra* (ATCC 15755).

Los testigos deberían prepararse antes de analizar las muestras. Los testigos han de contener 25 -150 CFU por 50 µl de forma que se consiga una concentración final de 1-10 CFU por ensayo. Se verificará dicha concentración en cada cultivo. Se utilizarán estos testigos en la preparación de los Testigos de Procesamiento de Muestras (Ver Preparación de Muestras).

1. Recomendaciones para la Preparación de los Testigos.
 - a. Introducir de 3 a 5 bolas de vidrio estériles de 3 mm en un tubo de cultivo limpio.
 - b. Añadir 1-2 ml de agua estéril A gregar el contenido de varias asas de 1 µl del cultivo apropiado. Cerrar el tubo y homogeneizarlo repetida e intensamente mediante Vórtex.
 - c. Dejar decantar la suspensión durante 15 minuto.
 - d. Transferir la fase flotante a un tubo de cultivo limpio. Ajustar la turbidez al equivalente de 1 McFarland mediante un nefelómetro estándar, utilizando una referencia McFarland.
 - e. Realizar una dilución al 1:100 de la suspensión, añadiendo 100 µl de la suspensión 1 McFarland en 10 ml de agua estéril. Tapar y agitar mediante Vórtex. Esta es la Dilución 1.
 - f. Realizar una 2ª dilución al 1:100 añadiendo 100 µl de Dilución 1 en 10 ml de agua estéril. Tapar y agitar mediante Vórtex. Esta es la Dilución 2. Esta dilución debería contener 25-150 CFU por 50 µl aprox.

Partes alícuotas y almacenamiento de los Testigos

- a. Las diluciones deberán ser repartidas en fracciones alícuotas en microtubos limpios para centrifugación, de 1,5 ml con tapón de rosca de un sólo uso, 500 µl y se conservarán congeladas a -20°C durante 6 meses o a -70°C durante un año. No usar congeladores con descongelación automática.

Los ensayos de los testigos positivos recomendados para *M. tuberculosis* sólo controlarán fallos substanciales de los reactivos. El testigo positivo se ha diseñado para controlar el efecto de los reactivos durante el procesamiento para la interferencia del exceso de los tampones de NaOH y fosfato Los cambios en tiempos o temperaturas de los procedimientos que pueden afectar la eficacia de la amplificación o la aceptabilidad del tiempo de selección pueden no ser detectados usando los testigos recomendados Se ensayarán testigos adicionales según normas o necesidades.

2. Control de inhibición de las muestras

Cuando el test MTD es negativo pero el diagnóstico del médico se inclina por una tuberculosis, es posible verificar si la muestra contiene un inhibidor utilizando el procedimiento siguiente:

- a. Poner 50 µl de Tampón de Dilución de las muestras en 2 tubos de lisis de las micobacterias (sobrecargada y no sobrecargada).
- b. Introducir 50 µl de Control Positivo de Amplificación y 450 µl de muestra en un tubo (sobrecargado). Añadir 450 µl de muestra en el segundo tubo (no sobrecargado). Realizar el test conforme al protocolo habitual.

Interpretación

Si el número de RLU (Relative Light Units - Unidades Relativas de Luz) obtenido en el luminómetro con el tubo sobrecargado es ≥ 30.000 RLU, la muestra no contiene inhibidor de amplificación y la muestra aparentemente no contiene diana por amplificar. Si el número de RLU obtenido con el tubo sobrecargado es < 30.000 RLU, la muestra contiene un inhibidor de la amplificación y debe analizarse otra muestra. Si el análisis repetido del tubo no sobrecargado es positivo, el resultado del test MTD puede ser considerado positivo. La explicación más plausible para este tipo de resultado es la variabilidad ligada al muestreo: la primera toma de prueba no contenía diana por amplificar, mientras que la segunda si contenía. El número de RLU del tubo no sobrecargado puede ser positivo o negativo, según si la toma de muestra contiene o no RNAr de micobacterias que pertenezcan al complejo *M. tuberculosis*.

3. Control de la contaminación del laboratorio

Para analizar la contaminación del laboratorio con amplicones de *M. tuberculosis*, proceder como sigue:

- a. Introducir 1 ml de agua estéril en un tubo limpio. Humedecer un escobillón estéril de poliéster o dacrón con agua estéril.
- b. Frotar el escobillón en la cubierta de la mesa de trabajo o del material por analizar.
- c. Colocar el escobillón en el tubo y mezclar suavemente. Retirar el escobillón estrujándolo contra la pared del tubo. Desechar el escobillón en un recipiente que contenga una solución de lejía diluida al 1/2 (mitad de lejía, mitad de agua).
- d. Distribuir 25 μ l de la solución así obtenida en un tubo de amplificación que contenga 50 μ l de Reactivo de Amplificación y 200 μ l de aceite para reacción de amplificación.
- e. Seguir las instrucciones del párrafo « TECNICA » para la amplificación y la detección.

Interpretación

Si los resultados son ≥ 30.000 RLU, la superficie estudiada está contaminada y debe ser descontaminada mediante un tratamiento con lejía, siguiendo las instrucciones del párrafo « TECNICA : Preparación del material ». Si se sospecha la presencia de contaminación del baño maría, proceder en la misma forma ya indicada, con 25 μ l de agua del baño maría, a condición que ésta no contenga productos antisépticos.

Preparación del material

1. El agua del baño de ultrasonidos debe ser desgasificada antes de cada ensayo con el fin de optimizar la transferencia de energía de los ultrasonidos.
 - a. Llenar el depósito del sonicador con agua de grifo a temperatura ambiente, hasta aproximadamente 1 cm del borde.

- b. Para desgasificar el agua en forma completa, hacer funcionar el sonicador durante 15 minutos.
2. Regular un bloque calefactor a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$, un bloque calefactor o un baño maría a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y un bloque calefactor o un baño maría a $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Limpiar las superficies de trabajo, material y pipetas con una dilución 1/2 de lejía antes de comenzar el análisis. La lejía debe permanecer en contacto con esos objetos durante al menos 15 minutos. Enjuagar con agua la superficie de trabajo para eliminar los restos de lejía. Cubrir la superficie sobre la cual será realizado el test con una hoja de protección plastificada.
4. Preparar el luminómetro Leader. Verificar que se cuenta con una cantidad suficiente de Reactivos de Detección I y II para realizar los tests y verificar que los tubos se encuentran cebados. Consultar el manual de empleo del luminómetro para las instrucciones de carga de los Reactivos de Detección (estos reactivos son vendidos por separado).

Preparación del reactivo

Reconstituir el Reactivo de Amplificación liofilizado (A) en su frasco (50 tests) con 3 ml de Tampón de Amplificación (AB). Homogeneizar mediante un Vortex. Dejar reposar el reactivo reconstituido a temperatura ambiente hasta que se vuelva transparente. El Reactivo de Amplificación reconstituido puede conservarse 2 meses a $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$. La solución debe llevarse a la temperatura ambiente antes de su utilización.

Preparación de las muestras

1. Etiquetar e identificar un número suficiente de tubos de Lisis Mycobacterium (LT) para analizar tanto las muestras, como un Testigo Positivo y otro Negativo bien sea de Amplificación o de Procesamiento de Muestras. Retirar y conservar los tapones
2. Pipetear 50 μl del Tampón de Dilución de las Muestras (SDB) Mycobacterium en todos los tubos de Lisis Mycobacterium (LT). Seguir las indicaciones facilitadas a continuación. Párrafos A o B para los testigos y C para las muestras
 - A. Testigos de Procesamiento de Muestras:

Para cada testigo agregar 1 ml de la solución ClNa/NaOH y 3 ml del tampón fosfato utilizado para analizar los esputos con 1 ml de agua estéril a un tubo de análisis de muestra.

 - I. Mezclar mediante Vórtex.
 - II. Transferir 450 μl de la solución tampón fosfato/ ClNa/NaOH y 50 μl de la dilución del Testigo al tubo correspondientemente etiquetado de Lisis Mycobacterium (LT).
 - B. Caso de emplear los Testigos de Amplificación, transferir 450 μl de dichos Testigos desde su envase al tubo de Lisis Mycobacterium (LT) correspondientemente etiquetado.

- C. Muestra Transferir 450 µl de una muestra descontaminada bien mezclada en Vórtex, desde su envase al tubo de Lisis Mycobacterium (LT) correspondientemente etiquetado.
3. Volver a tapar los tubos de Lisis Mycobacterium (LT) después de la adición de cada muestra.
4. Homogeneizar mediante Vórtex durante 3 segundos.

Lisis de las muestras

1. Insertar los Tubos de Lisis (LT) en el portatubos del sonicador de manera que la mezcla de reactivos en el fondo de los tubos se encuentre sumergida, manteniendo al mismo tiempo los tapones fuera del agua. Poner el portatubos en su lugar. **LOS TUBOS NO DEBEN EN NINGUN CASO ESTAR EN CONTACTO CON EL FONDO NI CON LAS PAREDES DEL SONICADOR.**
2. Hacer funcionar el sonicador durante 15 minutos, pero no más de 20 minutos. Las muestras y controles así tratados con ultrasonidos son « lisados ». **NO UTILIZAR EL VORTEX PARA AGITAR LOS LISADOS.**

Amplificación

1. Escribiendo en la parte alta de los tubos, identificar los tubos de polipropileno para amplificación (12 x 75 mm) con los números correspondientes a los números de identificación de los Tubos de Lisis (LT). Identificar también los tubos de amplificación para los controles de amplificación positivo y negativo.
2. Introducir 50 µl de Reactivo de Amplificación reconstituido en el fondo de cada tubo utilizando una pipeta de repetición. Añadir 200 µl de aceite para reacción de amplificación (O) en cada tubo, utilizando una pipeta de repetición.
3. **NO UTILIZAR EL VORTEX PARA LOS LISADOS.** Transferir 25 µl de cada lisado en el fondo del tubo de amplificación correspondiente, utilizando una nueva punta provista de filtro para cada transferencia. Los lisados restantes pueden ser conservados a 2°C - 8°C durante 7 días, o congelados a una temperatura igual o inferior a -20°C durante 1 mes. No utilizar congelador con descongelación automática. Si deben efectuarse otros tests con los lisados, llevar antes a temperatura ambiente. **NO UTILIZAR EL VORTEX PARA LOS LISADOS.**
4. Incubar los tubos en un bloque calefactor a 95° C durante 15 minutos, pero no más de 20 minutos.
5. Preparar la Solución Enzimática añadiendo 1,5 ml de Tampón de Dilución Enzimático (EDB) al Reactivo Enzimático liofilizado (E). Hacer girar para mezclar. No utilizar el agitador Vortex. El Reactivo Enzimático reconstituido es utilizable durante un mes a 2°C - 8°C o durante dos meses a una temperatura igual o inferior a -20°C si es dividido en alícuotas y congelado^B el día de su reconstitución. Si el test se realiza con fracciones alícuotas de enzimas congeladas, llevar a temperatura ambiente; no descongelar las fracciones alícuotas incubándolas a alta temperatura.

Para homogeneizar las fracciones alícuotas descongeladas, aspirar y expulsar suavemente la solución utilizando una pipeta de repetición antes de añadirla a los tubos de amplificación.

6. Transferir los tubos al bloque calefactor o al baño maría a $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y dejarlos enfriar durante 5 minutos. NO DEJAR QUE LOS TUBOS ALCANCEN LA TEMPERATURA AMBIENTE. NO CUBRIR EL BAÑO MARIA.
7. Cuando los tubos se encuentran a 42°C , añadir 25 μl de Reactivo Enzimático en cada tubo, utilizando una pipeta de repetición. Agitar para mezclar. Incubar a 42°C durante 30 minutos, pero no más de 60 minutos. Hay que utilizar hojas autoadhesivas o tapones durante esta etapa de incubación. NO CUBRIR EL BAÑO MARIA.
8. Después del período de incubación de 30 minutos, los tubos cubiertos pueden ser conservados a $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas o a -20°C hasta el día siguiente. Si son conservadas a -20°C hasta el día siguiente, los tubos deben ser totalmente descongelados a temperatura ambiente o, como máximo, a 60°C antes de cada etapa de hibridación, y deben ser cerrados con tapones mejor que con hojas autoadhesivas.

Hibridación

1. Reconstituir el Reactivo de Hibridación liofilizado (H) con 6 ml de Tampón de Hibridación (HB). El Reactivo de Hibridación (H) y el Tampón de Hibridación (HB) deben estar a temperatura ambiente antes de la reconstitución. Si el Tampón de Hibridación (HB) ha sido refrigerado, calentarlo hasta 60°C haciéndolo girar suavemente para verificar que todos los componentes están disueltos. Agitar con ayuda de un Vortex hasta que la solución se vuelva transparente (lo que puede demorar hasta un minuto) para verificar que todos los componentes hayan quedado disueltos. El Reactivo de Hibridación reconstituido es utilizable durante un mes a $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ o durante dos meses a una temperatura igual o inferior a -20°C si es dividido en alícuotas y congelado^C el día de su reconstitución. Si el Reactivo de Hibridación reconstituido ha sido refrigerado o congelado, calentarlo hasta 60°C haciéndolo girar suavemente para que todos sus componentes queden disueltos.
2. Añadir 100 μl de Reactivo de Hibridación reconstituido a cada tubo utilizando una pipeta de repetición. Cubrir los tubos con hojas autoadhesivas o con tapones. Agitar los tubos mediante un Vortex a velocidad media 3 veces durante por lo menos 1 segundo^D. Para alcanzar una correcta homogeneidad de los tubos de reactivos, mantenerlos en posición vertical y dejar que la mezcla alcance la mitad superior de la pared del tubo durante la agitación (para evitar cualquier contaminación, no dejar que la mezcla de reactivos tome contacto con las hojas autoadhesivas o con los tapones). Cuando la homogeneización ha sido correctamente realizada, la mezcla debe presentar un color amarillo uniforme.
3. Incubar a 60°C durante 15 minutos, pero no más de 20 minutos, en un bloque calefactor o al baño maría.

Selección

1. El Reactivo de Selección (S) debe estar a temperatura ambiente antes de comenzar el test. Retirar los tubos del baño maría o del bloque calefactor a 60°C y añadir 300 µl de Reactivo de Selección (S) utilizando una pipeta de repetición. Cubrir los tubos con hojas autoadhesivas o tapones. Agitar mediante un Vortex a velocidad media, 3 veces durante al menos 1 segundo^D. Para alcanzar una buena homogeneización de los tubos de reactivos, mantenerlos en posición vertical y dejar que la mezcla alcance la mitad superior de la pared del tubo durante la agitación (para evitar cualquier contaminación, no dejar que la mezcla de reactivos entre en contacto con las hojas autoadhesivas o los tapones). Cuando se ha realizado correctamente la homogeneización, la mezcla debe presentar en este momento un color rosa uniforme.
2. Incubar a 60°C durante 15 minutos, pero no más de 16 minutos, en un bloque calefactor o al baño maría.
3. Retirar los tubos del baño maría o del bloque calefactor. Dejar los tubos a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos, pero no más de una hora. Retirar las hojas autoadhesivas o los tapones justo antes de la fase de detección.

Detección

1. Programar el protocolo apropiado en el luminómetro. Elegir una lectura en 2 segundos.
2. Para eliminar cualquier residuo de la superficie de los tubos, secarlos con papel absorbente sin pelusas y húmedo; introducir a continuación en el luminómetro siguiendo las instrucciones del manual de empleo. Los tubos deben ser leídos dentro de la hora siguiente a la etapa de selección.
3. Una vez terminado el análisis, retirar los tubos del luminómetro.
4. Después de la lectura de los tubos, llenarlos con precauciones con una solución de lejía diluida a 1/10 (un volumen de lejía por 9 volúmenes de agua), utilizando un matraz. Dejar la lejía en contacto durante por lo menos una hora antes de desechar los tubos, para evitar la contaminación del laboratorio con amplicones.
5. Los portatubos deben ser descontaminados sumergiéndolos por completo en una solución de lejía diluida al 1/2 durante al menos 15 minutos. Deben ser enjuagados a continuación con agua y secados, o dejados secar al aire.
6. Descontaminar el laboratorio y el material utilizando una solución de lejía diluida a 1/2.

Repetición del test

1. Si se repite el test, llevar los lisados a temperatura ambiente. NO UTILIZAR VORTEX PARA LOS LISADOS.
2. Seguir a continuación la Técnica, comenzando por la etapa de amplificación.

OBSERVACIONES

A. Reactivos

1. El Reactivo Enzimático no debe quedar a temperatura ambiente más de 15 minutos después de haber sido reconstituido.
2. El Tampón de Hibridación (HB) puede precipitar. Calentar y agitar el Tampón de Hibridación (HB) o el Reactivo de Hibridación reconstituido a 60°C para disolver el precipitado.

B. Temperatura

1. La amplificación, la hibridación y la selección son reacciones termodependientes; en consecuencia, es necesario mantener el baño maría o el bloque calefactor a las temperaturas recomendadas.
2. Antes de añadir el Reactivo Enzimático, dejar enfriar los tubos durante 5 minutos con el fin de que alcancen 42°C. Esta temperatura permite alcanzar rendimientos de amplificación óptimos.
3. El respeto de la temperatura es fundamental para la fase de amplificación (42° ± 1°C).

C. Tiempos

Es imperativo respetar los tiempos indicados en el párrafo « TECNICA ».

D. Baño maría

1. El nivel de agua en el baño maría debe mantenerse de manera que la mezcla de reactivos en el fondo de los tubos se encuentre sumergido, pero que el agua no penetre en los tubos.
2. Durante la fase de amplificación, el baño maría no debe quedar cubierto con el fin de evitar que la condensación caiga sobre o dentro de los tubos.

E. Agitación utilizando 'un Vortex

Es importante disponer de una mezcla homogénea durante las etapas de hibridación y de selección, particularmente después de añadir el Reactivo de Hibridación (H) reconstituido (la mezcla adopta un color amarillo uniforme) y del Reactivo de Selección (S) (la mezcla adopta un color rosa uniforme).

La agitación utilizando un Vortex permite obtener una suspensión uniforme. Cuando los reactivos son colocados en un tubo de reactivos y son expuestos a una fuente de energía exterior, se produce una rotación rápida de la solución en torno al eje del tubo. Esto se traduce en una suspensión uniforme. Para que la homogeneización se realice correctamente, utilizando un Vortex, los tubos deben mantenerse verticalmente, sosteniéndolos por la parte superior. El líquido debe entonces alcanzar la mitad superior del tubo durante la agitación. Durante etapas de hibridación y selección, esta agitación es realizada 3 veces seguidas y debe durar por lo menos 1 segundo cada vez.

INTERPRETACION DEL ENSAYO

El resultado de la muestra analizada mediante el Test Amplified para la detección directa del complejo Mycobacterium Tuberculosis (MTD) se interpreta basándose en un resultado negativo inicial (<30.000 RLU), un resultado positivo inicial (≥ 500.000 RLU), o un resultado equívoco inicial (de 30.000 a 499.999 RLU). Debe repetirse el ensayo MTD del lisado reservado cuando el resultado del ensayo inicial resulte equívoco. Un resultado repetido del lisado > 30.000 se considera positivo.

A. Resultados de Control de Calidad y Aceptabilidad

Los testigos deberán producir los siguientes valores:

- Testigo Negativo de Amplificación < 20.000 RLU
- Testigo Positivo de Amplificación ≥ 500.000 RLU
- Testigo Negativo del Procesamiento de Muestra < 20.000 RLU
- Testigo Positivo del Procesamiento de Muestra $\geq 1.000.000$ RLU

No deberán entregarse los resultados de ensayos MTD de pacientes que no cumplan los criterios arriba reseñados. Consultar el párrafo "RESOLUCIÓN DE INCIDENTES" para información adicional. Cada laboratorio debe determinar los valores objetivo para los testigos utilizando los resultados de ensayo para cada lote de testigos preparados.

B. Resultados de Ensayos en Pacientes

Caso de que los testigos no arrojen las cifras esperadas, los resultados de ensayo en muestras de pacientes del mismo lote no deberán ser entregados

Resultado:

- ≥ 500.000 RLU positivo para ARNr del complejo *M. tuberculosis*
- < 30.000 RLU negativo para ARNr del complejo *M. tuberculosis*
- 30.000 a 499.999 RLU probable positivo para ARNr del complejo *M. tuberculosis*; repetir para verificación:

Repetir ≥ 30.000 RLU positivo para ARNr del complejo *M. tuberculosis*

Repetir < 30.000 RLU negativo para ARNr del complejo *M. tuberculosis*

PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del ensayo MTD se interpretarán con juntamente con otros datos clínicos y de laboratorio disponibles para el analista. Basándose en el grado de sospecha clínica, se debería considerar el ensayo de una muestra adicional.

Si el ensayo inicial MTD fuese positivo a ≥ 500.000 RLU, o el ensayo MTD repetido fuese positivo a ≥ 30.000 RLU, se emitirá el siguiente informe:

Informe:	Se ha detectado ARNr del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Frotis BAAR (positivo o negativo).
Información adicional:	Cultivo para detección BAAR en curso. La muestra puede contener tanto MOTT como <i>M. tuberculosis</i> o sólo <i>M. tuberculosis</i> . Este ensayo no debe ser la única base para diagnosticar la tuberculosis. El valor positivo predictivo para un frotis negativo del paciente es inferior a un frotis positivo del paciente. Resulta particularmente importante en ensayos de poblaciones donde la prevalencia de tuberculosis resulte baja y los valores positivos predictivos de los métodos de diagnóstico se reducen de forma correspondiente.

Caso de que el resultado del ensayo MTD inicial o repetido resultase negativo a < 30.000 RLU, se informaría como sigue:

Informe:	No se ha detectado ARNr para el complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> is Frotis BAAR (positivo o negativo).
Información adicional:	No hay detección de ARNr del complejo tuberculosis. Cultivo para detección BAAR en curso. La muestra puede no contener <i>M. tuberculosis</i> , el resultado puede ser falso negativo debido al bajo número de <i>M. tuberculosis</i> e presencia o ausencia de MOTT, o el resultado puede ser falso debido a la interferencia en el ensayo de muestras inhibitoras. Se recomienda analizar muestras de otro paciente si clínicamente se sospechase la presencia de tuberculosis activa o de la inhibición de la muestra.

LIMITES

Este test está destinado exclusivamente a la detección de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* a partir de muestras preparadas según los procedimientos NALC-NaOH o NaOH recomendados por el CDC7. Esta prueba sólo puede ser utilizada con muestras preparadas a partir de esputos (inducidos o expectorados), de muestras bronquiales (lavados bronco-alveolares o aspirados bronquiales) o de aspirados traqueales.

El test MTD es específico para las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, a saber, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, y *M. canetti* (12, 13), pero no diferencia estas especies entre sí. *M. celatum* y *M. pseudo-terrae* pueden provocar reacciones cruzadas si se presentan en concentraciones superiores a 30 UFC por test. En todo caso, *M. celatum* y *M. pseudo-terrae* son rara vez aisladas en clínica.

La calidad de los resultados del test se encuentra relacionada con la calidad de la toma de muestra y con su transporte; con la variabilidad de la toma de muestras; con los errores técnicos del laboratorio; con los errores de identificación de las muestras y con los errores de transcripción de los resultados. Un test negativo no excluye la presencia de una micobacteria del complejo *M. tuberculosis* en la muestra.

VALORES ESPERADOS

A. Gama de valores de control obtenidos durante los ensayos clínicos

La gama de valores obtenidos por los controles (RLU) durante los ensayos clínicos realizados en 7 sitios ha sido la siguiente:

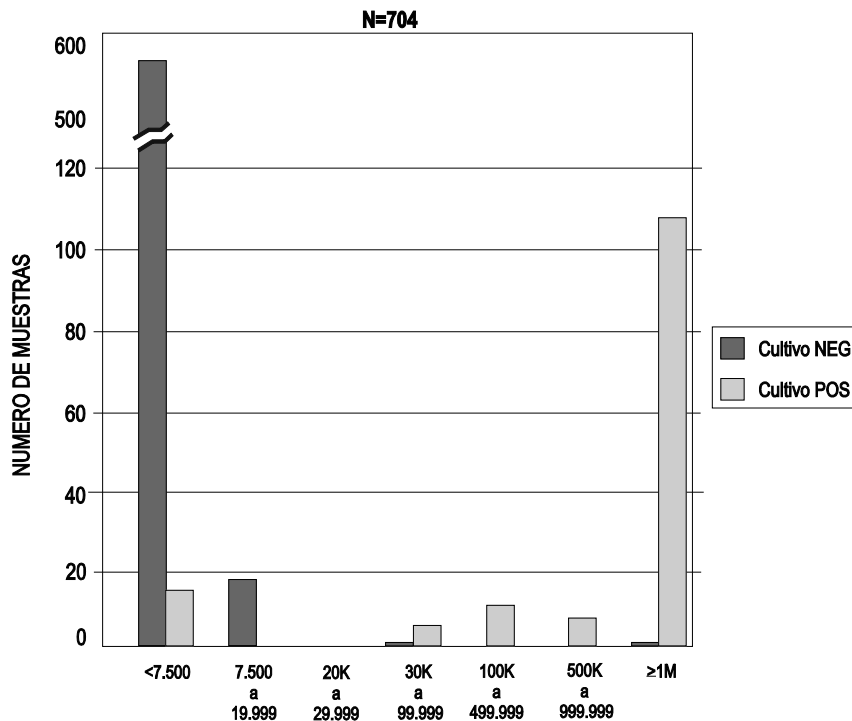
RLU (N=704)		
	Intervalo	Media
Control Positivo de Amplificación	556.245 to >2.000.000	>2.000.000
Control Negativo de Amplificación	904 to 18.754	3.041

B. Gama de los valores obtenidos para las muestras clínicas

Para las 127 muestras MTD-positivas, los valores se encontraban entre 35.777 y > 2.000.000 RLU.

Para las 577 muestras MTD-negativas, los valores se encontraban entre 573 y 19.176 RLU.

Tabla de resultados obtenidos a partir de muestras de pacientes no tratados (7 sitios)



Resultados del Cultivo

M. tuberculosis NEG	554	19	0	1	0	0	1
M. tuberculosis POS	13	0	0	4	7	6	108

La frecuencia de los resultados en RLU para todas estas muestras, después de resolver las discordancias, figura a continuación. La resolución de las discordancias se basa en el análisis de otras muestras, positivas en cultivo, procedentes de un mismo paciente y/o en el diagnóstico final del médico tratante.

RESULTADOS

A. Evaluación clínica

Los resultados del test MTD en su forma original han sido evaluados durante ensayos clínicos realizados en seis laboratorios, comparando los resultados obtenidos por examen de frotis con resultados del cultivo, en 6.079 muestras procedentes de 2.609 pacientes. Entre éstas, 4.000 muestras provenían de 1.898 pacientes que no habían recibido tratamiento antituberculoso. Los seis sitios representaban zonas geográficas diferentes: cinco centros hospitalarios de grandes ciudades de EE.UU. que poseen un servicio especializado para la tuberculosis, y un laboratorio público.

Los resultados del test MTD en su forma actual han sido evaluados en siete sitios, comparando los resultados del test MTD con los resultados del cultivo. Los siete centros que participaron en el test representaban zonas geográficas diferentes: seis centros hospitalarios de grandes ciudades de EE.UU. que poseían un servicio especializado para la tuberculosis y un laboratorio nacional público de micobacteriología. Las muestras analizadas provenían de pacientes que no habían recibido tratamiento antituberculoso. 132 dieron resultados positivos en cultivo con respecto a las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. MTD detectó 119 de estas muestras como cultivos positivos; y 7 muestras contenían micobacterias no tuberculosas además de *M. tuberculosis*.

MUESTRAS PROCEDENTES DE PACIENTES NO TRATADOS Comparación MTD / cultivo (N=704)

POR PACIENTE (antes de resolver las discordancias)	Cultivo	
	+	-
MTD +	54	4
MTD -	4	221

POR PACIENTE (después de resolver las discordancias)	Cultivo	
	+	-
MTD +	56	2
MTD -	4	221

POR MUESTRA (antes de resolver las discordancias)	Cultivo	
	+	-
MTD +	119	8
MTD -	13	564

POR MUESTRA (después de resolver las discordancias)	Cultivo	
	+	-
MTD +	125	2
MTD -	13	564

Pacientes sospechosos de estar afectados por una tuberculosis pulmonar activa que no se encontraban bajo tratamiento han sido incluidos en este estudio. La prevalencia total de los pacientes que presentaron un cultivo positivo de *M. tuberculosis* fue de 20,5%.

Por paciente, fueron determinadas una sensibilidad media de 93,3 % y una especificidad media de 99,1 % en relación al cultivo. Por muestra, fueron determinadas una sensibilidad media de 90,6 % y una especificidad media de 99,6 % en relación al cultivo. En el cuadro que sigue se proporciona la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), con intervalos de confianza del 95%, para las estimaciones de resultados. Todos los datos visualizados son presentados después de resolver las discordancias en base al análisis de otras muestras positivas en cultivo procedentes del mismo paciente y/o en base al diagnóstico final del médico tratante.

Por paciente:

	Porcentaje medio	Número / Total	Intervalo de confianza del 95%
Sensibilidad	93,3%	56 / 60	83,8 – 98,2%
Especificidad	99,1%	221 / 223	96,8 – 99,9%
VPP	96,6%	56 / 58	88,1 – 99,6%
VPN	98,2%	221 / 225	95,5 – 99,5%

Por muestra:

	Porcentaje medio	Número / Total	Intervalo de confianza del 95%
Sensibilidad	90,6%	125/138	84,4 – 94,9%
Especificidad	99,6%	564/566	98,7 – 100%
VPP	98,4%	125/127	94,4 – 99,8%
VPN	97,7%	564/577	96,2 – 98,8%

De las 564 muestras negativas en cultivo y MTD-negativas para las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, 114 muestras contenían micobacterias atípicas, puestas en evidencia por cultivo, 64 procedían de pacientes cuyas otras muestras permitieron aislar micobacterias atípicas por cultivo y 169 provenían de pacientes en los cuales no se aisló en cultivo ninguna micobacteria.

B. Precisión

Paneles de muestras, consistentes en 2 muestras negativas, 2 muestras débilmente positivas (= 100 UFC/ test) y 2 muestras moderadamente positivas (= 1000 UFC/ test) fueron analizadas en tres centros. Las muestras positivas fueron preparadas agregando cantidades conocidas de *M. tuberculosis* a una mezcla de muestras moderadamente inhibitoras. Las muestras y los controles de amplificación positivo y negativo fueron analizados por triplicado dos veces al día, durante 3 días, en los tres centros.

Dada que la variabilidad de los resultados no era significativa entre un sitio y otro o entre un día y otro, los resultados de los tres centros pudieron ser consolidados y son presentados a continuación. Los valores de lectura medidos en RLU son limitados por la resolución del tubo fotomultiplicador del luminómetro. Por esta razón, los valores superiores a 2.000.000 RLU son llevados a 2.000.000 RLU. No se indican las desviaciones tipo ni los coeficientes de variación.

	Precisión			
	Número de observaciones	% de resultados corrects	Amplitud (RLU)	Media (RLU)
Muestras 1: Fuerte paridad	108	100%	154.103 - >2.000.000	>2.000.000
Muestras 2: Débil paridad	108	99,1%	16.324 - >2.000.000*	>2.000.000
Muestras 3: Negativas	108	100%	2.004 - 5.693	2.689
Control positivo	54	100%	>2.000.000	>2.000.000
Control negativo	54	100%	2.272 - 4.241	2.944

*Un resultado negativo observado

C. Reproducibilidad

El estudio de reproducibilidad fue realizado analizando 25 muestras; se intercalaron controles de amplificación negativos entre cada muestra para formar un total de 50 muestras. El panel de reproducibilidad fue analizado en cuatro centros.

En total, 100 % (120/120) de las muestras negativas y 98,8 % (79/80) de las muestras positivas dieron los resultados esperados.

D. Especificidad analítica

La especificidad del test MTD fue evaluada con la ayuda de bacterias, hongos y virus. En el caso de las bacterias y de los hongos, los tests de especificidad incluyeron 160 cepas (151 especies procedentes de 62 géneros) de micobacterias muy cercanas a *M. tuberculosis*, otros microorganismos responsables de enfermedades respiratorias y un panel filogenético de microorganismos de la flora comensal del aparato respiratorio. Las cepas tipo fueron cultivos ATCC (American Type Culture Collection), y 5 cepas fueron suministradas por laboratorios de análisis. Los lisados, preparados a partir de cultivos en fase activa de crecimiento (o de RNAr, en tres casos) fueron analizados conforme al protocolo del test MTD a razón de aproximadamente 5×10^7 UFC por test. Únicamente las cepas del complejo *M. tuberculosis* dieron resultados positivos, con excepción de cepas de *M. celatum* y *M. pseudo-terrae*.

Con concentraciones superiores a 30 UCF por test, las cepas de *M. celatum* y algunas cepas de *M. pseudo-terrae* dieron resultados positivos (26.772 RLU para *M. celatum* y 19.470 a 49.976 RLU para *M. pseudo-terrae*).

E. Límite de detección

Treinta cepas de *M. tuberculosis* provenientes de regiones geográficas muy variadas, incluidos representantes de cepas resistentes y de cepas sensibles a los antibióticos, fueron detectadas mediante el test MTD. El test MTD pudo detectar hasta 1 UFC por test de cada una de las 30 cepas.

F. Test de sobrecarga

Fueron analizados RNAr de *Mycobacterium tuberculosis* con una concentración de 25 fg (equivalente a 5 UFC por test) en presencia de aproximadamente 540.000 UFC por test (450 µl) de los siguientes organismos no dianas: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. terrae*, *Nocardia asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae*, *Gordona sputi* y *Rhodococcus bronchialis*. Todos los resultados fueron positivos para el RNAr de *M. tuberculosis* en presencia de estos organismos no dianas, que por lo tanto no crearon interferencia.

RESOLUTION DE INCIDENTES

OBSERVACION	CAUSAS POSIBLES	RECOMENDACIONES
Valores Elevados de los Testigos Negativos de Amplificación o de Testigos Negativos de Procesamiento de Muestras (≥ 20.000 RLU)	Homogeneización insuficiente o adición de volumen insuficiente tras añadir el Mycobacterium Selection.	Conseguir una homogeneización completa. Garantizar que el volumen del reactivo añadido sea Correcto.
	Amplificación de los contaminantes introducidos por falta de precaución durante la preparación de las reacciones.	Debe prestarse gran cuidado a la distribución de los reactivos mediante pipetas. Los tubos ya utilizados deben ser descontaminados con una solución de lejía diluida al 1/10, tal como se indica en el párrafo « TECNICA ». Las superficies de trabajo, los bloques calefactores, los baños marías y las pipetas deben ser descontaminadas con una solución de lejía diluida al 1/2, como se indica en el párrafo « TECNICA ».
	Omisión de la etapa de enfriamiento de 5 minutos.	
	Contaminación del laboratorio o de los reactivos.	
Valores Bajos de los Testigos Positivos de Amplificación o de Testigos Positivos de Procesamiento de Muestras (< 500.000 RLU)	Omisión del secado de los tubos antes de la lectura con el luminómetro.	
	Fase fuera del rango de temperatura recomendado.	Ajustar según convenga para conseguir los rangos especificados de temperatura.
	Adición del Reactivo de Amplificación, vertiendo el líquido en las paredes del tubo y no directamente al fondo del mismo.	Verificar la temperatura del baño maría y/o del bloque calefactor y ajustarlo si fuera necesario para respetar las temperaturas recomendadas.
	Homogeneización insuficiente después de añadir el Reactivo de Hibridación reconstituido.	Agitar cuidadosamente con el Vortex como se ha especificado (ver el párrafo « Hibridación / 2 »). Verificar la formación de una solución de color amarillo uniforme después de la agitación.
	Volumen de Reactivo de Selección demasiado importante.	
	No respeto del tiempo recomendado para la etapa de selección.	Respetar los 15 minutos de incubación a 60°C, durante la etapa de Selección.
	La temperatura de los tubos ha descendido por debajo de 42°C después de la incubación a 95°C.	Transferir directamente los tubos del bloque calefactor a 95°C al baño maría / bloque calefactor a 42°C.
	Los conductos que llevan el Reactivo de Detección se encuentran obstruidos	Enjuagar los conductos con agua caliente, como se indica en el manual de empleo del instrumento.

NOTAS

- A. Los bloques calefactores deben tener pocillos previstos para los tubos 12 x 75 mm. Se recomienda utilizar bloques calefactores .
- B. Se recomienda para el almacenamiento de la alícuotas congeladas tubos de microcentrífuga con tapa. Las alícuotas individuales congeladas pueden congelarse y descongelarse solo de una vez. No deben usarse congeladores con sistema “frost-free”.
- C. Se recomienda para almacenar las alícuotas congeladas crioviales de 5 ml. Las alícuotas individuales congeladas pueden congelarse y descongelarse solo de una vez. No deben usarse congeladores con sistema “frost-free”.
- D. Los rendimientos de los Vortex pueden diferir, según el material utilizado: puede ser necesario adaptar el tiempo de agitación. Regular la velocidad del aparato y seguir las instrucciones descritas en « TECNICA, párrafo E », con el fin de permitir que la mezcla de reactivos pueda alcanzar la mitad superior de la pared del tubo. Una homogenización correcta es indispensable para obtener resultados precisos. El tiempo de agitación puede ser llevado a 15 segundos sin afectar los resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association, 1983. *Levels of laboratory services for mycobacterial diseases*. Am. Rev. Respir. Dis. **128**:213.
2. **Arnold, L.J., P.W. Hammond, W.A. Wiese, and N.C. Nelson**, 1989. Assay formats involving acridinium- ester-labeled DNA probes. Clin. Chem. **35**:1588-1594.
3. **Bradley, S.T., S.L. Reed and A. Catanzaro**, 1996. Clinical Efficacy of the Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **153**:1606-1610.
4. Centers for Disease Control, 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
5. Centers for Disease Control and Prevention, and National Institute of Health. May, 1993. 3rd Edition. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. pp. 93-96.
6. **Collins, F. M.**, 1989. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. Clin. Microbiol. Rev. **2**: 360-377.
7. **Kent, P.T. and G.P. Kubica**, 1985. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control: Principles and definitions; Approved Guideline. NCCLS document C24-A. Villanova, PA: NCCLS; 1991.
9. **Pitchenik, A.E., D. Fertel, and A.B. Block**, 1988. *Mycobacterial Disease: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention*. Clin. Chest Med. **9**:425-441.
10. **Roberts, G.D., E.W. Koneman, and Y.K. Kim**, 1991. Mycobacterium, pp. 304-339. In A. Balows, et al. (eds.), Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. **Simone, P.M. and Iseman, M.D.**, 1992. Drug-resistant Tuberculosis: A Deadly and Growing Danger. J. Resp. Dis. **13**:960-971.
12. **Wayne, L.G.**, 1982. Microbiology of the tubercle bacilli. Am. Rev. Respir. Dis. **125** (3 pt 2):31-41.
13. **Van Soolingen, D.**, et al. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Intl. J. Syst. Bacteriol. **47**:1236-1245.
14. **Kerleguer A., Koeck J. L., Fabre M., Gérôme P., Teyssou R., Hervé V.**, 2002. Application of a Grey-Zone for the Interpretation of The "Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for the Rapid Diagnosis of Respiratory Tuberculosis." Esm May 2002.
15. **Coll P, Garrigó M., Moreno C., Marti N.**, 2002. "Routine Use of E-MTD (Hologic) For Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Samples." Esm 2002.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA



Asistencia al cliente: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Asistencia técnica: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Para obtener más información, visite www.hologic.com.

Hologic, Amplified MTD, y Leader son marcas comerciales y/o marcas comerciales registradas de Hologic, Inc. y/o de sus subsidiarias en los Estados Unidos y/o en otros países. All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Todas las demás marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a de sus respectivos propietarios.

Este producto puede estar cubierto por una o más de las patentes estadounidenses identificadas en www.hologic.com/patents.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

AW-12601-301 Rev. 003 (ES)

©1995 - 2018 Hologic, Inc. Reservados todos los derechos.
2018-03