

**TEST AMPLIFIED PER L'IDENTIFICAZIONE DIRETTA DEI MICOBATTERI DEL  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX****Kit da 50 test**

(bioMérieux cod. 39006/Hologic Cat. N. 301001)

<b>MODALITÀ D'IMPIEGO</b> .....	<b>2</b>
<b>AVVERTENZA</b> .....	<b>2</b>
<b>PRECAUZIONI D'USO</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
<b>PRINCIPIO OPERATIVO</b> .....	<b>4</b>
<b>REAGENTI (Kit da 50 test)</b> .....	<b>5</b>
<b>CONSERVAZIONE</b> .....	<b>6</b>
<b>PRELIEVO, CONSERVAZIONE, TRASPORTO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI</b> ....	<b>7</b>
Prelievo e conservazione del campione.....	7
Trasporto.....	7
Trattamento (decontaminazione e concentrazione).....	7
Conservazione dei campioni trattati .....	7
<b>MATERIALE</b> .....	<b>7</b>
<b>PROCEDIMENTO</b> .....	<b>9</b>
Controlli.....	9
Preparazione del materiale .....	11
Preparazione del reagente.....	12
Preparazione dei campioni .....	12
Lisi dei campioni .....	12
Amplificazione .....	13
Ibridazione.....	14
Selezione.....	14
Lettura .....	15
Ripetizione del test.....	15
<b>OSSERVAZIONI</b> .....	<b>15</b>
<b>INTERPRETAZIONE DEL TEST</b> .....	<b>16</b>
<b>REFERTAZIONE DEI RISULTATI</b> .....	<b>17</b>
<b>LIMITI DEL TEST</b> .....	<b>18</b>
<b>VALORI ATTESI</b> .....	<b>18</b>
<b>PERFORMANCE</b> .....	<b>19</b>
<b>RISOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI</b> .....	<b>23</b>
<b>NOTE</b> .....	<b>24</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>25</b>

## MODALITÀ D'IMPIEGO

Il test Hologic AMPLIFIED PER L'IDENTIFICAZIONE DIRETTA DEI MICOBATTERI DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX (MTD) è un test che impiega una sonda a DNA diretta contro un bersaglio amplificato. Questa sonda permette di identificare *in vitro* gli acidi nucleici dei micobatteri del *Mycobacterium tuberculosis* complex. Questo test viene effettuato su campioni provenienti da escreti (indotti o espettorati), prelievi bronchiali (lavaggi bronco-alveolari o broncoaspirati) ed aspirati tracheali.

## AVVERTENZA

Non è ancora stata dimostrata l'efficacia di questo test per l'identificazione diretta di rRNA di *M. tuberculosis* a partire da altri campioni clinici (ad esempio ematici, urinari o coprologici). Le performance del test MTD sono state unicamente stabilite per campioni trattati in base alla metodica descritta e conservati per i periodi e alle temperature di cui al presente foglietto illustrativo.

I campioni che evidenziano risultati positivi devono essere messi in coltura allo scopo di determinare l'eventuale presenza di micobatteri diversi da quelli appartenenti al *M. tuberculosis* complex o micobatteri atipici. Devono essere altresì effettuati sia test di sensibilità agli anti-tubercolari che, successivamente, colture per la ricerca di bacilli alcolacido resistenti (BAAR) al fine di precisare la sottospecie del TB complex presente (ad esempio *M. bovis*).

Nel quadro delle prove cliniche, sono stati sottoposti al test anche prelievi eseguiti su bambini, su pazienti HIV positivi e pazienti infettati da micobatteri atipici. In ogni caso il numero di questi test non ha consentito di confrontare statisticamente le performance del test nei vari gruppi sopra citati.

Non sono state valutate le performance del test su prelievi da pazienti sotto trattamento anti-tubercolare al fine di effettuare un monitoraggio terapeutico o confermare una guarigione.

Il kit MTD non deve essere impiegato per testare i campioni ad alta concentrazione ematica.

## PRECAUZIONI D'USO

- A. Il test è riservato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*.
- B. Il test MTD è specifico per i micobatteri del *M. tuberculosis* complex, vale a dire *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti* (13), ma non consente di diversificare fra queste specie. *M. celatum* e *M. terrae*-like possono indurre reazioni incrociate se presenti a concentrazioni superiori a 30 CFU (Unità Formanti Colonie) per test. Tuttavia, *M. celatum* e *M. terrae*-like vengono raramente isolati in clinica.
- C. Un risultato negativo non esclude la presenza nel campione di un micobatterio del *M. tuberculosis* complex. La qualità dei risultati dipende dal prelievo e dalla manipolazione, dalla variabilità del prelievo dei campioni, dagli errori tecnici del laboratorio, dagli errori di identificazione dei campioni e dagli errori di trascrizione dei risultati.

- D. Il test è riservato all'identificazione dei micobatteri del *M. tuberculosis* complex a partire da campioni preparati in base ai metodi NALC-NaOH o NaOH raccomandate dai Centers for Disease Control (CDC)<sup>7</sup>. Questo test deve essere esclusivamente impiegato per campioni concentrati preparati a partire da escreti (indotti o espettorati), aspirati tracheali o prelievi bronchiali (lavaggi bronco-alveolari o broncoaspirati). Quando il campione viene rimesso in sospensione nella soluzione di tampone fosfato, assicurarsi che la concentrazione di fosfato sia di 67 mM<sup>7</sup>.
- E. Evitare qualsiasi contatto della cute, degli occhi e delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II (bioMérieux cod. 39300 / Cat. N. 201791). In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua le parti interessate. Se si verificassero versamenti di reagenti, diluirli abbondantemente con acqua prima di asciugare la superficie.
- F. Adottare le normali precauzioni durante l'esecuzione di questo test<sup>4</sup>. La preparazione dei campioni digeriti e decontaminati così come le fasi del test MTD devono essere effettuate osservando le norme di sicurezza microbiologica di classe 2<sup>5</sup>.
- G. Usare esclusivamente il materiale compreso nel kit o materiale da laboratorio monouso.
- H. Occorre decontaminare i banchi, le pipette e il materiale con una soluzione di candeggina diluita al 50% (metà candeggina, metà acqua), seguendo le istruzioni fornite nel paragrafo "PROCEDIMENTO". Lasciare la candeggina in situ per 15 minuti, risciacquare con acqua e asciugare per eliminare i residui di candeggina.
- I. Per condurre questo test è necessario impiegare pipette munite di puntali provvisti di filtro. Durante il trasporto del lisato dalle provette di lisi alle provette di amplificazione, ricorrere a puntali extra-lunghi. Ad ogni fase cambiare il puntale. Non passare sopra alle altre provette nel portaprovette. I puntali usati devono essere immediatamente gettati in un apposito contenitore per rifiuti biologici.
- J. Durante l'impiego di una micropipetta a volume fisso per l'erogazione dei reagenti, una volta introdotto il lisato nelle provette non toccare la provetta con il puntale della pipetta al fine di minimizzare i rischi di contaminazione fra provette. I reagenti devono essere dispensati contro la parete della provetta per evitare spruzzi. Un'erogazione estremamente accurata permetterà di ridurre i rischi di contaminazione crociata.
- K. Non usare le stesse pipette per le tappe a monte e a valle dell'amplificazione.
- L. Dopo la lettura dei risultati per mezzo del luminometro, decontaminare le provette e gettarle seguendo le istruzioni fornite nei paragrafi "PROCEDIMENTO" e "OSSERVAZIONI" al fine di evitare la contaminazione del laboratorio attraverso gli amplicon.
- M. Non riusare MAI i fogli autoadesivi e i tappi impiegati durante una fase precedente. I tappi devono essere gettati in un apposito contenitore subito dopo la loro rimozione per evitare qualsiasi contaminazione crociata. Le etichette devono essere perfettamente applicate sulla parte superiore delle provette di reazione.
- N. Non coprire il bagno-maria durante le incubazioni, soprattutto nel caso in cui vengano impiegati tappi (la condensa sul coperchio può costituire una fonte di contaminazione).

- O. Per ottenere la massima precisione nei risultati, dopo aver aggiunto il Reagente di Selezione è necessario operare una perfetta omogeneizzazione mediante Vortex.
- P. Si raccomanda di utilizzare, per la fase HPA (Hybridization Protection Assay), un'area separata per ridurre al minimo la contaminazione da amplicon del test. Questa area dedicata deve essere separata dall'area per la preparazione dei campioni e dei reagenti e dall'area per l'amplificazione.
- Q. Per aiutare a prevenire la contaminazione da amplicon delle aree di lavoro, il laboratorio deve disporre le aree di lavoro secondo un flusso uni-direzionale. Per esempio, procedere dall'area di preparazione dei campioni e dei reattivi all'area di amplificazione e quindi a quella dell'HPA. I campioni, i materiali ed i reattivi non possono essere riportati nell'area dove è stata eseguita la fase precedente. Inoltre il personale non può tornare nelle precedenti aree di lavoro senza adeguate protezioni anti-contaminazioni. E' fortemente raccomandato di non utilizzare, per l'esecuzione del test MTD, il locale di bio-sicurezza utilizzato per il trattamento dei campioni.

## INTRODUZIONE

Il test MTD impiega il metodo TMA (Transcription-Mediated Amplification) ed il metodo HPA (Hybridization Protection Assay)<sup>2</sup> al fine di identificare in maniera qualitativa l'RNA ribosomiale (rRNA) dei micobatteri del *M. tuberculosis* complex. Il test MTD identifica l'RNA degli organismi coltivabili e non coltivabili. Il *M. tuberculosis* complex comprende le sotto-specie *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti* (12, 13). Il test MTD identifica tutti i microrganismi del TB complex. Tuttavia, *M. microti* infetta unicamente gli animali; *M. bovis* viene trasmesso soltanto molto raramente dagli animali infetti all'essere umano; *M. africanum*, dal canto suo, è responsabile della tubercolosi polmonare nell'Africa tropicale<sup>12</sup>; *M. tuberculosis* è di gran lunga la sotto-specie più comune, responsabile di un tasso di morbilità significativamente alto in tutto il mondo. Recentemente i CDC hanno diffuso dati relativi ad un aumento dei casi di tubercolosi nei soggetti colpiti da AIDS, fra gli immigrati e ad un incremento della trasmissione della patologia nelle popolazioni ad alto rischio<sup>6,9</sup>. Si registra inoltre un aumento del numero di ceppi resistenti, ma anche multi-resistenti agli anti-tubercolari<sup>11</sup>. Nel campo della salute pubblica le conseguenze devono essere attentamente valutate.

I metodi di coltura tradizionali consentono l'osservazione della crescita di *M. tuberculosis* in un arco temporale variabile da 1 a 8 settimane<sup>7,10</sup>. Il test MTD, invece, permette di identificare l'rRNA dei micobatteri del *M. tuberculosis* complex in 2,5 - 3,5 ore. Anche se non consente la realizzazione dell'antibiogramma, il test MTD identifica il *M. tuberculosis* in modo rapido e affidabile. Ciò permette di gestire in modo ottimale i reparti di isolamento dei presidi ospedalieri al fine di iniziare immediatamente un trattamento adeguato e prevenire così la propagazione della malattia grazie all'individuazione diretta e all'isolamento dei soggetti infetti<sup>3</sup>.

## PRINCIPIO OPERATIVO

Il test MTD è un test suddiviso in due fasi (amplificazione e rivelazione) effettuate in una stessa provetta. In primo luogo, mediante sonicazione viene liberato l'RNA ribosomiale dei micobatteri. Mediante il calore si denatura e si rompe la struttura secondaria dell'rRNA. Il metodo di amplificazione TMA amplifica quindi un bersaglio specifico di rRNA micobatterico attraverso un intermedio di DNA ad una temperatura costante di 42°C. In questo modo

vengono prodotte molteplici copie di rRNA micobatterico (amplicon). Le sequenze dell'amplicon di rRNA, specifiche dei micobatteri del *M. tuberculosis* complex, vengono poi identificate servendosi della metodica di ibridazione degli acidi nucleici HPA<sup>2</sup>. Il Reagente di Ibridazione del test MTD contiene una sonda a DNA a catena singola collegata ad un marker chemiluminescente. Questa sonda è complementare alle sequenze di RNA specifiche dei micobatteri del *M. tuberculosis* complex. La sonda contenente queste sequenze specifiche forma degli ibridi stabili RNA-DNA. Dopo la fase di selezione, il segnale luminoso emesso dagli ibridi viene misurato mediante un luminometro Leader.

## REAGENTI (Kit da 50 test)

**Nota:** per informazioni sulle indicazioni di pericolo e i consigli di prudenza che possono essere associati ai reagenti, consultare la libreria delle schede di sicurezza (Safety Data Sheet Library) all'indirizzo [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

I reagenti per il test MTD vengono forniti come di seguito indicato:

### TRAY DEI REAGENTI PER AMPLIFICAZIONE

Nome del reagente	Volume
<b>Tampone di Diluizione dei Campioni (SDB)</b> <i>Soluzione tampone Tris contenente &lt; 3 % di detergente</i>	1 x 2,5 ml
<b>Reagente di Amplificazione (A)</b> <i>Acidi nucleici liofilizzati in una soluzione tampone Tris contenente il 5 % di agente legante</i>	1 x 3 ml (dopo ricostituzione)
<b>Tampone di amplificazione (AB)</b> <i>Soluzione acquosa contenente conservanti</i>	1 x 3 ml
<b>Reagente di amplificazione oleoso (olio per la reazione di amplificazione) (O)</b> <i>Olio al silicone</i>	1 x 10 ml
<b>Reagente Enzimatico (E)</b> <i>Transcriptasi inversa e RNA polimerasi liofilizzate in una soluzione tampone HEPES contenente &lt; 10 % di agente legante e ≥ 15 mM di N-Acetil-L-Cisteina</i>	1 x 1,5 ml (dopo ricostituzione)
<b>Tampone di Diluizione Enzimatica (tampone di diluizione degli enzimi) (EDB)</b> <i>Soluzione tampone Tris contenente un surfactante e glicerolo</i>	1 x 1,5 ml

## TRAY DEI REAGENTI PER IBRIDAZIONE

Nome del reagente	Volume
<b>Reagente di Ibridazione (H)</b> <i>&lt; 100 ng/fiacone di sonda a DNA non infettiva associata ad un marker chemiluminescente, liofilizzata, in una soluzione tampone succinato contenente un agente legante e un detergente</i>	1 x 6 ml (dopo ricostituzione)
<b>Tampone di Ibridazione (HB)</b> <i>Soluzione tampone succinato contenente &lt; 4 % di detergente</i>	1 x 6 ml
<b>Reagente di Selezione (S)</b> <i>Soluzione tampone borato contenente un surfactante</i>	1 x 15 ml
<b>Provette di Lisi (LT)</b> <i>Sfere di vetro, agente legante</i>	2 x 25 provette

## CONSERVAZIONE

A. Le soluzioni o i componenti non ricostituiti sottoindicati devono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2°C e 25°C e possono essere impiegati fino alla data di scadenza indicata:

- Tampone di Diluizione dei Campioni (SDB)
- Reagente di Amplificazione (A)
- Tampone di Amplificazione (AB)
- Reagente Enzimatico (E)
- Tampone di Diluizione Enzimatico (EDB)
- Reagente di Ibridazione (H)

Il Reagente di Amplificazione ricostituito (A) è stabile per 2 mesi se conservato a temperature comprese tra 2°C e 25°C. Il Reagente di Ibridazione (H) e il Reagente Enzimatico (E) sono stabili per un mese ad una temperatura compresa tra 2°C e 25°C dopo ricostituzione o per due mesi a una temperatura uguale o inferiore a -20°C nel caso in cui siano aliquotati e congelati il giorno della loro ricostituzione. Le aliquote congelate devono essere impiegate il giorno in cui vengono scongelate. Non utilizzare congelatori a sbrinamento automatico.

B. I seguenti componenti devono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2°C e 25°C e possono essere impiegati fino alla data di scadenza indicata:

- Reagente di amplificazione oleoso (O)
- Tampone di Ibridazione (HB)
- Reagente di Selezione (S)
- Provette di lisi (LT)

## PRELIEVO, CONSERVAZIONE, TRASPORTO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

### Prelievo e conservazione del campione

Prima del trasporto e del trattamento i campioni devono essere trasferiti in contenitori di plastica sterili e conservati ad una temperatura compresa tra 2°C e 25°C. I campioni utilizzati nelle valutazioni cliniche erano staticoconservati per meno di 4 giorni (in genere meno di 24 ore) prima del relativo trattamento.

### Trasporto

Trasportare i campioni in laboratorio il più rapidamente possibile ottemperando alle normative in vigore.

### Trattamento (decontaminazione e concentrazione)

I campioni con elevata concentrazione ematica non devono essere sottoposti al test MTD. Questo test è stato progettato e sviluppato per identificare l'RNA dei micobatteri del *M. tuberculosis* complex ricorrendo a campioni preparati in base ai metodi di decontaminazione NALC-NaOH o NaOH, impiegando dall'1% all'1,5% di NaOH per un tempo variabile da 15 a 20 minuti e una centrifugazione ad una velocità superiore o uguale a  $\geq 3000 \text{ g}^7$ .

### Conservazione dei campioni trattati

I campioni possono essere conservati, prima del test, per un massimo di 3 giorni a 2°C - 8°C. Possono essere anche conservati ad una temperatura compresa fra -20°C e -70°C per un massimo di 6 mesi. Non utilizzare congelatori a sbrinamento automatico.

## MATERIALE

### A. Materiale fornito

#### TRAY DEI REAGENTI PER AMPLIFICAZIONE

Composizione del kit (bioMérieux cod. 39006 / Hologic Cat. N. 301001)	50 Test
Tampone di Diluizione del Campione (SDB)	1 x 2,5 ml
Reagente di Amplificazione (A)	1 x 3 ml (dopo ricostituzione)
Tampone di Ricostituzione (AB)	1 x 3 ml
Reagente oleoso (olio per reazione di amplificazione) (O)	1 x 10 ml
Reagente Enzimatico (E)	1 x 1,5 ml (dopo ricostituzione)
Tampone di Diluizione Enzimatico (EDB)	1 x 1,5 ml

## TRAY DEI REAGENTI PER IBRIDAZIONE

Composizione del kit ( <i>bioMérieux cod. 39006 / Hologic Cat. N. 301001</i> )	50 Test
Reagente di Ibridazione (H)	1 x 6 ml (dopo ricostituzione)
Tampone di Ibridazione (HB)	1 x 6 ml
Reagente di Selezione (S)	1 x 15 ml
Provette di lisi (LT)	2 x 25 provette
Fogli autoadesivi	1 pacchetto

## B. Materiale necessario ma non fornito:

- Micropipette con capacità di erogazione 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl e 450 µl
- Vortex
- Acqua sterile (filtrata o autoclavata)
- Provette di coltura
- Biglie di vetro sterili da 3 mm
- Provette per microcentrifuga con tappi a vite
- Porta-provette per provette di reazione
- Puntali per pipetta provvisti di filtro (1000 µl)
- Controlli Positivi di Amplificazione (ad es. *M. tuberculosis*, ATCC 25177 o ATCC 27294)
- Controlli Negativi di Amplificazione (ad es. *M. gordonae*, ATCC 14470 o *M. terrae*, ATCC 15755)
- Candeggina (soluzione di ipoclorito di sodio al 5,25 %)
- Fogli plastificati per la protezione dei banconi
- Micropipette a volume fisso Eppendorf

## C. Materiale supplementare disponibile presso il vostro distributore Hologic:

	Cat. N.
Sonicatori ( <i>bioMérieux cod. 39409</i> )	901104
Incubatori (42°C ± 1°C, 60°C ± 1°C, 95°C ± 5°C) <sup>A</sup> ( <i>bioMérieux cod. 39405, 39406, 39407</i> )	105524, 105524F, 105524J
Luminometro Leader 50i ( <i>bioMérieux cod. 39400</i> )	103100i
Kit di Reagenti di Rivelazione ( <i>bioMérieux cod. 39300</i> )	201791

	Cat. N.
Controlli dell'Amplificazione MTD ( <i>bioMérieux cod. 39223</i> )	301043F
Porta-provette per sonicatore ( <i>bioMérieux cod. 39313</i> )	104027
Porta-provette per provette di reazione ( <i>bioMérieux cod. 39311</i> )	104769
Puntali lunghi provvisti di filtro per pipetta (1250 µl) ( <i>bioMérieux cod. 39315</i> )	104316
Provette in polipropilene da 12 x 75 mm ( <i>bioMérieux cod. 39308</i> )	102440
Tappi in polipropilene per provette da 12 x 75 mm ( <i>bioMérieux cod. 39320</i> )	400713

## PROCEDIMENTO

### Controlli

I ceppi impiegati per il Controllo Positivo di Amplificazione devono appartenere al *M. tuberculosis* complex, come il ceppo non virulento H37Ra (ATCC 25177) od il ceppo virulento H37Rv (ATCC 27294). I ceppi impiegati per il Controllo Negativo di Amplificazione devono appartenere ai MOTT, come il *M. goodii* (ATCC 14470) od il *M. terrae* (ATCC 15755). I controlli devono essere preparati prima di iniziare l'analisi dei campioni.

I controlli devono contenere 25 - 150 CFU in 50 µl in modo da arrivare ad una concentrazione finale nel test di 1 - 10 CFU. Questa concentrazione può essere verificata tramite coltura. Questi controlli saranno utilizzati per la preparazione dei Campioni di Controllo (Vedere Preparazione dei campioni).

1. Preparazione dei controlli consigliata
  - a. Inserire da 3 - 5 biglie di vetro da 3 mm all'interno di una provetta per coltura pulita.
  - b. Aggiungere 1 - 2 ml di acqua sterile. Prelevare diverse volte mediante un'ansa (1 µl) la coltura appropriata. Richiudere la provetta e vortexarla più volte a velocità elevata.
  - c. Lasciare riposare la sospensione per 15 minuti.
  - d. Trasferire il supernatante in una provetta di coltura pulita. Regolare la torbidità ad 1 McFarland servendosi di un nefelometro.
  - e. Eseguire una diluizione 1:100 della sospensione mettendo 100 µl della sospensione 1 McFarland in 10 ml di acqua sterile. Chiudere e vortexare. Questa è la diluizione 1.

- f. Eseguire una seconda diluizione 1 : mettendo 100 µl della diluizione 1 in 10 ml di acqua sterile. Chiudere e vortexare. Questa è la diluizione 2; dovrebbe contenere approssimativamente 25 - 150 CFU in 50 µl.

#### Suddivisione in aliquote e conservazione dei Controlli

- a. Le diluizioni, suddivise in aliquote monouso (500 µl), vanno distribuite in provette da microcentrifuga con tappo a vite e si conservano per 6 mesi se congelate a -20°C o per 1 anno se congelate a -70°C. Non utilizzare congelatori a sbrinamento automatico.

Testare il controllo positivo per il *M. tuberculosis* raccomandato consente di evidenziare unicamente gli errori grossolani dei reagenti. Il controllo positivo è concepito per monitorare l'effetto interferente dell'eccesso di NaOH e di tampone fosfato sui reagenti utilizzati durante il procedimento. Variazioni del procedimento in termine di tempo o di temperatura che possono alterare l'efficienza dell'amplificazione non possono essere rilevate tramite il controllo raccomandato. Dei controlli addizionali possono essere testati in accordo con le linee guida o con specifici requisiti.

#### 2. Controllo di inibizione dei campioni

Quando il test MTD risulta negativo, ma il medico propende per una diagnosi di tubercolosi, è possibile verificare la presenza di eventuali inibitori agendo come segue:

- a. Dispensare 50 µl di Tampone di Diluizione del Campione in 2 provette di lisi.
- b. Dispensare 50 µl di Controllo Positivo di Amplificazione e 450 µl di campione nella I° provetta. Dispensare 450 µl dello stesso campione nella II° provetta. Condurre il test seguendo il solito protocollo.

#### Interpretazione

Se la quantità di RLU (Relative Light Units) misurata dal luminometro nella I° provetta è  $\geq 30.000$  RLU, il campione non contiene inibitori dell'amplificazione e non contiene apparentemente il bersaglio da amplificare. Se la quantità di RLU ottenuta nella I° provetta è  $< 30.000$  RLU, il campione contiene un inibitore dell'amplificazione e deve essere testato un altro campione. Se il test ripetuto nella II° provetta è positivo, il risultato del test MTD può essere dichiarato positivo. La spiegazione più plausibile per questo tipo di risultato è la variabilità legata al campione: il primo prelievo non conteneva alcun bersaglio da amplificare, contrariamente al secondo. La quantità di RLU nella II° provetta può essere positiva o negativa a seconda che il prelievo contenga o meno rRNA di micobatteri appartenenti al *M. tuberculosis* complex.

### 3. Controllo della contaminazione del laboratorio

Per rivelare una eventuale contaminazione da amplicon di *M. tuberculosis* nel laboratorio, procedere nel modo seguente:

- a. Dispensare 1 ml di acqua sterile in una provetta pulita. Inumidire un tampone sterile in poliestere o in dacron con acqua sterile.
- b. Sfregare il tampone sul banco o sul materiale da testare.
- c. Inserire il tampone nella provetta e mescolare lentamente. Estrarre il tampone premendolo contro la parete della provetta per strizzarlo accuratamente. Gettare il tampone in un recipiente contenente una soluzione di candeggina diluita al 50% (metà candeggina, metà acqua).
- d. Dispensare 25 µl della soluzione così ottenuta in una provetta di amplificazione contenente 50 µl di Reagente di Amplificazione e 200 µl di olio per la reazione di amplificazione.
- e. Per l'amplificazione e l'identificazione attenersi alle istruzioni del paragrafo "PROCEDIMENTO".

#### Interpretazione

Se i risultati sono  $\geq 30.000$  RLU, la superficie testata è contaminata e deve essere decontaminata mediante trattamento con candeggina; a questo scopo seguire le istruzioni del paragrafo "PROCEDIMENTO : Preparazione del materiale". Nel caso in cui si sospetti una contaminazione del bagno-maria, procedere come sopra indicato utilizzando 25 µl di acqua del bagno-maria che non contenga alcun prodotto antisettico.

### Preparazione del materiale

1. Per il trasferimento ottimale dell'energia sonica, prima di ogni sonicazione l'acqua contenuta nel sonicatore deve essere accuratamente sgassata eseguendo il procedimento seguente:
  - a. Riempire il serbatoio del sonicatore con acqua corrente a temperatura ambiente fino ad 1 cm circa dal bordo.
  - b. Per sgassare completamente l'acqua, far funzionare il sonicatore per 15 minuti.
2. Impostare un incubatore ad una temperatura di  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , un incubatore o un bagno-maria a  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e un incubatore o un bagno-maria a  $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
3. Prima di iniziare l'analisi pulire le superfici di lavoro, il materiale e le pipette con una diluizione 1/2 di candeggina. La candeggina deve agire almeno per 15 minuti. Risciacquare la superficie di lavoro con acqua per eliminare le tracce di candeggina. Coprire la superficie su cui verrà realizzato il test servendosi di un foglio protettivo plastificato per banconi.
4. Preparare il luminometro Leader. Assicurarsi che vi sia una quantità sufficiente di Reagenti di Rivelazione I e II per completare i test e che le provette siano

correttamente inseriti. Consultare il manuale d'uso del luminometro per le istruzioni relative alla sostituzione dei Reagenti di Rivelazione (venduti a parte).

### Preparazione del reagente

Ricostituire il Reagente di Amplificazione liofilizzato (A) nel suo flacone (50 test) utilizzando 3 ml di Tampone di Amplificazione (AB). Omogeneizzare servendosi di un Vortex. Far riposare il reagente ricostituito a temperatura ambiente fino a quando non assuma una colorazione chiara. Il Reagente di Amplificazione ricostituito può essere conservato per 2 mesi ad una temperatura compresa tra 2°C e 25°C. La soluzione deve essere riportata a temperatura ambiente prima dell'uso.

### Preparazione dei campioni

1. Contrassegnare un numero di provette di lisi (LT) sufficiente per testare i campioni ed 1 di ciascuno dei Controlli Positivo e Negativo di Amplificazione o dei Controlli del Trattamento del Campione Positivo e Negativo. Togliere e conservare i tappi.
2. Pipettare 50 µl del Tampone di Diluizione dei Campioni (SDB) in tutte le provette di lisi (LT).

Eseguire quanto indicato nei paragrafi A e B per i controlli e C per i campioni.

#### A. Controlli del Trattamento dei Campioni:

Per ogni controllo aggiungere, in una provetta per l'analisi dei campioni, 1 ml della soluzione NALC/NaOH e 3 ml del tampone fosfato utilizzati per il trattamento degli espettorati ad 1 ml di acqua sterile.

- I. Mescolare con il vortex.
- II. Trasferire 450 µl della soluzione NALC/NaOH/tampone fosfato e 50 µl della diluizione dei ceppi di Controllo nella corrispondente provetta di lisi (LT) contrassegnata.

B. Se vengono utilizzati i Controlli dell'Amplificazione, trasferire 450 µl del Controllo dell'Amplificazione dal suo contenitore nella corrispondente provetta di lisi (LT) contrassegnata.

C. Campione: Trasferire 450 µl del campione decontaminato ed accuratamente vortexato dal suo contenitore alla corrispondente provetta di lisi (LT) contrassegnata.

3. Dopo aver aggiunto tutti i campioni, tappare nuovamente le provette di lisi (LT).
4. Vortexare per 3 secondi.

### Lisi dei campioni

1. Inserire le provette di lisi nel porta-provette del sonicatore in modo che la miscela di reazione sul fondo delle provette venga completamente sommersa, mantenendo i tappi fuori dall'acqua. Posizionare il portaprovette nel sonicatore. **IN NESSUN CASO LE PROVETTE DEVONO TOCCARE IL FONDO O LE PARETI DEL SONICATORE.**

2. Fare funzionare il sonicatore per 15 minuti, avendo cura di non superare i 20 minuti. I campioni ed i controlli trattati con ultrasuoni sono ora indicati " lisati ". **NON USARE ILVORTEX PER AGITARE I LISATI.**

### Amplificazione

1. Contrassegnare le provette di polipropilene per l'amplificazione (12 x 75 mm) scrivendo sulla parte superiore delle stesse i numeri di identificazione (corrispondenti a quelli scritti sulle provette di lisi). Analogamente, contrassegnare le provette di amplificazione per i Controlli di Amplificazione Positivo e Negativo.
2. Erogare 50 µl di Reagente di Amplificazione ricostituito sul fondo di ogni provetta servendosi di una micropipetta a volume fisso Eppendorf. Aggiungere 200 µl di olio per reazione di amplificazione (O) in ogni provetta utilizzando una micropipetta ripetitiva.
3. **NON USARE IL VORTEX PER I LISATI.** Trasferire 25 µl di ogni lisato sul fondo della rispettiva provetta di amplificazione servendosi, per ogni lisato, di un nuovo puntale dotato di filtro. I lisati rimanenti possono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2°C e 25°C per 7 giorni o, congelati ad una temperatura uguale o inferiore a -20°C, per 1 mese. Non utilizzare congelatori a sbrinamento automatico. Nel caso in cui debbano essere effettuati altri test sui lisati, fare in modo che prima siano portati a temperatura ambiente. **NON USARE IL VORTEX PER I LISATI.**
4. Incubare le provette in un incubatore a 95°C per 15 minuti, senza superare però i 20 minuti.
5. Preparare la Soluzione Enzimatica aggiungendo 1,5 ml di Tampone di Diluizione Enzimatica (EDB) al Reagente Enzimatico liofilizzato (E). Non vortexare. Il Reagente Enzimatico ricostituito è stabile per un mese ad una temperatura di 2°C - 8°C o per due mesi ad una temperatura uguale od inferiore a -20°C nel caso in cui sia stato aliquotato e congelato<sup>B</sup> il giorno della sua ricostituzione. Se il test verrà effettuato con aliquote di enzimi congelati, riportarle in primo luogo a temperatura ambiente; non scongelare le aliquote incubandole a temperatura elevata. Per omogeneizzare le aliquote scongelate, aspirare e rilasciare lentamente la soluzione servendosi di una micropipetta a volume fisso prima di aggiungerla alle provette di amplificazione.
6. Trasferire le provette nell'incubatore o nel bagno-maria a 42° ± 1°C e lasciare che si raffreddino per 5 minuti. **EVITARE CHE LE PROVETTE RAGGIUNGANO LA TEMPERATURA AMBIENTE. NON COPRIRE IL BAGNO-MARIA.**
7. Quando le provette raggiungono i 42°C aggiungere in ognuna, con una micropipetta ripetitiva a siringa, 25 µl di Reagente Enzimatico. Mescolare delicatamente. Incubare a 42°C per 30 minuti, senza oltrepassare i 60 minuti. In questa fase di incubazione è necessario usare fogli autoadesivi o tappi. **NON COPRIRE IL BAGNO-MARIA.**
8. Dopo il periodo di incubazione della durata di 30 minuti, le provette possono essere conservate 2 ore ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C o, congelate a -20°C, fino al giorno seguente. Nel caso in cui vengano conservate a -20°C fino all'indomani, le provette devono essere completamente scongelate a temperatura ambiente o al

massimo a 60°C prima della fase di ibridazione e devono essere chiuse con i tappi piuttosto che con i fogli autoadesivi.

## Ibridazione

1. Ricostituire il Reagente di Ibridazione liofilizzato (H) con 6 ml di Tampone di Ibridazione (HB). Il Reagente di Ibridazione (H) e il Tampone di Ibridazione (HB) devono essere portati a temperatura ambiente prima della ricostituzione. Se il Tampone di Ibridazione (HB) è stato refrigerato, riscaldarlo a 60°C e mescolarlo lentamente per assicurare una perfetta solubilizzazione di tutti i componenti. Vortexare fino a che la soluzione non diventa chiara (questa operazione può richiedere sino ad un minuto) per ottenere la completa solubilizzazione di tutti gli elementi. Il Reagente di Ibridazione *ricostituito* può essere usato per un mese ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C o per due mesi ad una temperatura uguale od inferiore a -20°C nel caso in cui sia stato aliquotato e congelato<sup>C</sup> il giorno della sua ricostituzione. Se il Reagente di Ibridazione *ricostituito* è stato refrigerato o congelato, riscaldarlo a 60°C e agitarlo lentamente al fine di ottenere una perfetta solubilizzazione di tutti i componenti.
2. Dispensare 100 µl di Reagente di Ibridazione *ricostituito* in ogni provetta servendosi di una micropipetta ripetitiva a siringa. Coprire le provette con fogli autoadesivi o con tappi. Vortexare 3 volte le provette a velocità media per almeno 1 secondo<sup>D</sup>. Per ottenere una buona omogeneizzazione delle provette di reazione, tenerle in posizione verticale e lasciare che durante l'agitazione la miscela raggiunga la metà superiore della parete della provetta (evitare qualsiasi contatto della miscela di reazione con i fogli autoadesivi o con i tappi per prevenire eventuali contaminazioni). Dopo la corretta esecuzione dell'omogeneizzazione, la miscela dovrà assumere una colorazione gialla uniforme.
3. Incubare a 60°C per 15 minuti, senza superare però i 20 minuti, in un incubatore o in un bagno-maria.

## Selezione

1. Prima di iniziare il test, il Reagente di Selezione (S) deve essere portato a temperatura ambiente. Estrarre le provette dal bagno-maria o dall'incubatore a 60°C e aggiungere 300 µl di Reagente di Selezione (S) con una micropipetta ripetitiva a siringa. Coprire le provette con fogli autoadesivi o con tappi. Vortexare 3 volte a velocità media e per almeno 1 secondo<sup>D</sup>. Per ottenere una buona omogeneizzazione delle provette di reazione, tenerle in posizione verticale e lasciare che durante l'agitazione la miscela raggiunga la metà superiore della parete della provetta (evitare qualsiasi contatto della miscela di reazione con i fogli autoadesivi o con i tappi per prevenire un'eventuale contaminazione). Dopo la corretta esecuzione dell'omogeneizzazione, la miscela dovrà assumere una colorazione rosa uniforme.
2. Incubare a 60°C per 15 minuti, senza superare però i 16 minuti, in un incubatore o in un bagno-maria.

3. Estrarre le provette dal bagno-maria o dall'incubatore. Lasciare le provette a temperatura ambiente almeno per 5 minuti, senza oltrepassare il limite di un'ora. Rimuovere i fogli autoadesivi od i tappi proprio prima della lettura.

### Letture

1. Programmare il protocollo giusto sul luminometro. Impostare una lettura a 2 secondi.
2. Per eliminare tutti i residui dalla superficie delle provette, asciugarle con carta assorbente inumidita, priva di lanugine, e inserirle successivamente nel luminometro, attenendosi alle istruzioni fornite nel manuale d'uso. Le provette devono essere lette entro un'ora dalla fase di selezione.
3. Una volta conclusa l'analisi, estrarre le provette dal luminometro.
4. Dopo la lettura delle provette, riempirle accuratamente con una soluzione di candeggina diluita al 1:10 (un volume di candeggina + 9 volumi di acqua), servendosi di una spruzzetta. Il contatto con la candeggina deve durare almeno un'ora; successivamente, eliminare le provette per prevenire ogni possibile contaminazione da amplicon del laboratorio.
5. I porta-provette devono essere decontaminati immergendoli completamente in una soluzione di candeggina diluita 1:2 per almeno 15 minuti. Successivamente dovranno essere risciacquati con acqua e asciugati o esposti all'aria.
6. Decontaminare il laboratorio e il materiale con una soluzione di candeggina diluita al 1:2.

### Ripetizione del test

1. Nel caso in cui occorra ripetere il test, riportare i lisati preparati a temperatura ambiente. **NON USARE IL VORTEX PER I LISATI.**
2. **ATTENERSI AL PROCEDIMENTO** iniziando dalla fase di amplificazione.

### OSSERVAZIONI

#### A. Reagenti

1. Il Reagente Enzimatico non deve rimanere a temperatura ambiente per più di 15 minuti dopo la ricostituzione.
2. Il Tampone di Ibridazione (HB) può precipitare. Riscaldare e agitare il tampone di Ibridazione (HB) o il Reagente di Ibridazione *ricostituito* a 60°C per sciogliere il precipitato.

#### B. Temperatura

1. L'amplificazione, l'ibridazione e la selezione sono reazioni temperatura-dipendenti, di conseguenza è assolutamente necessario mantenere il bagno-maria o l'incubatore alle temperature prestabilite.

2. Prima di aggiungere il Reagente Enzimatico, lasciare raffreddare le provette per 5 minuti affinché raggiungano i 42°C. Questa temperatura permette di ottenere performance ottimali di amplificazione.
3. Il rispetto della temperatura è fondamentale per la fase di amplificazione ( $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

#### C. Tempi

È assolutamente necessario rispettare i tempi indicati nel paragrafo “PROCEDIMENTO”.

#### D. Bagno-maria

1. Il livello dell'acqua nel bagno-maria deve essere tale da garantire che il fondo delle provette sia sempre immerso, evitando comunque che l'acqua penetri nelle provette.
2. Durante la fase di amplificazione, il bagno-maria non deve essere coperto per evitare il rischio che la condensa possa cadere sopra o all'interno delle provette.

#### E. Agitazione mediante Vortex

Durante le fasi di ibridazione e di selezione è assolutamente necessario avere a disposizione una miscela omogenea, in particolare dopo l'aggiunta del Reagente di Ibridazione (H) *ricostituito* (la miscela si colora uniformemente di giallo) e del Reagente di Selezione (S) (la miscela si colora uniformemente di rosa).

L'agitazione con il Vortex permette di ottenere una sospensione uniforme. Quando i reagenti vengono introdotti in una provetta di reazione ed esposti ad una fonte di energia esterna, si crea una rapida rotazione della soluzione attorno all'asse della provetta. Il risultato è una sospensione uniforme. Per realizzare una corretta omogeneizzazione con il Vortex, le provette devono essere impugnate nella parte superiore e tenute in posizione verticale. Durante l'agitazione il liquido deve raggiungere la metà superiore della provetta. Durante le fasi di ibridazione e di selezione questa agitazione deve essere ripetuta per 3 volte vortexando per almeno 1 ogni volta.

## INTERPRETAZIONE DEL TEST

I risultati del test AMPLIFIED PER LA RICERCA DIRETTA DEI MICOBATTERI DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX vengono interpretati nel modo seguente: un risultato è negativo per un segnale  $< 30.000$  RLU, è positivo quando il segnale è  $\geq 500.000$  RLU ed è dubbio per valori di RLU compresi tra  $30.000$  e  $499.999$  RLU. Quando il risultato iniziale dell'esame è dubbio, il test MTD deve essere ripetuto partendo dal lisato conservato. Il campione va considerato positivo se il risultato della ripetizione partendo dal lisato è  $> 30.000$  RLU.

## A. Controllo di Qualità e accettabilità dei risultati

I controlli devono dare i seguenti risultati :

- Controllo Negativo di Amplificazione < 20.000 RLU
- Controllo Positivo di Amplificazione ≥ 500.000 RLU
- Controllo Negativo del Trattamento del Campione < 20.000 RLU
- Controllo Positivo del Trattamento del Campione ≥ 500.000 RLU

Nel caso in cui i valori dei controlli non corrispondano ai valori sopra indicati, i risultati dei campioni clinici non sono validi e non possono essere refertati. Vedere il paragrafo “ SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI ” per maggiori informazioni.

Ogni laboratorio deve stabilire valori soglia per i controlli in base ai risultati ottenuti per ogni serie di controlli.

## B. Risultati del test per i campioni clinici

Se i valori dei controlli non corrispondono ai valori previsti, i risultati dei campioni clinici non sono validi e non possono essere refertati.

- ≥ 500.000 RLU positivo per l'rRNA dei micobatteri del *M. tuberculosis* complex
- < 30.000 RLU negativo per l'rRNA dei micobatteri del *M. tuberculosis* complex

## REFERTAZIONE DEI RISULTATI

Nel caso in cui il risultato del test MTD sia ≥ 500.000 RLU, refertare i risultati nel modo seguente :

---

Refertazione : Rilevato rRNA del *Mycobacterium tuberculosis* complex. Esame microscopico (positivo o negativo).

Informazioni aggiuntive : Coltura per la ricerca di BAAR in corso. Il campione può contenere sia micobatteri non tubercolari (MOTT) che il *M. tuberculosis* oppure soltanto il *M. tuberculosis*. Questo test non può costituire l'unica base per diagnosticare la tubercolosi. Il valore predittivo positivo per un paziente, se l'esame microscopico è negativo, è più basso rispetto a quello di pazienti in cui sia risultato positivo. Questo è particolarmente importante nei test sulla popolazione quando la prevalenza della tubercolosi è bassa ed i valori predittivi positivi dei metodi diagnostici è di conseguenza ridotto.

---

Se il risultato del test MTD è < 30.000 RLU, refertare i risultati nel modo seguente:

---

Refertazione : Non rilevato rRNA del *Mycobacterium tuberculosis* complex. Esame microscopico (positivo o negativo).

Informazioni aggiuntive : Non è stato rilevato rRNA di micobatteri del *Mycobacterium tuberculosis* complex. Coltura per la ricerca di BAAR in corso. Il campione non contiene apparentemente micobatteri del *M. tuberculosis* complex, ma il risultato può essere un falso negativo se la quantità di *M. tuberculosis* è bassa che il campione contenga o meno micobatteri non tubercolari - o se il campione contiene inibitori che interferiscono sull'esame. Se c'è il sospetto di una tubercolosi in fase attiva o si sospetta la presenza di inibitori, si raccomanda di ripetere il test su un nuovo prelievo del paziente.

---

## LIMITI DEL TEST

Questo test è destinato esclusivamente la ricerca dei micobatteri del *M. tuberculosis* complex a partire da campioni preparati secondo le procedure NALC-NaOH o NaOH raccomandate dal CDC<sup>7</sup>. Questo test può essere impiegato soltanto con campioni preparati a partire da escreti (indotti od espettorati), prelievi bronchiali (lavaggi bronco-alveolari o broncoaspirati) ovvero aspirati tracheali.

Il test MTD è specifico per i micobatteri del *M. tuberculosis* complex, vale a dire *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti* ma non consente di differenziare queste specie fra loro. *M. celatum* e *M. terrae*-like possono provocare reazioni crociate se presenti in concentrazioni superiori a 30 CFU per test. Tuttavia, *M. celatum* e *M. terrae*-like vengono raramente isolati a livello clinico.

La qualità dei risultati del test è correlata alla qualità del prelievo e del suo trasporto, alla variabilità del prelievo dei campioni, agli errori tecnici del laboratorio, agli errori di identificazione dei campioni e agli errori di trascrizione dei risultati. Un test negativo non esclude la presenza nel campione di un micobatterio del *M. tuberculosis* complex.

## VALORI ATTESI

### A. Gamma dei valori di controllo rilevati durante le prove cliniche

La gamma dei valori ottenuti per i controlli (RLU) durante le prove cliniche effettuate su 7 siti è stata la seguente:

	RLU (N=704)	
	Intervallo	Media
<b>Controllo positivo di Amplificazione</b>	da 556,245 a >2.000.000	>2.000.000
<b>Controllo negativo di Amplificazione</b>	da 904 a 18.754	3.041

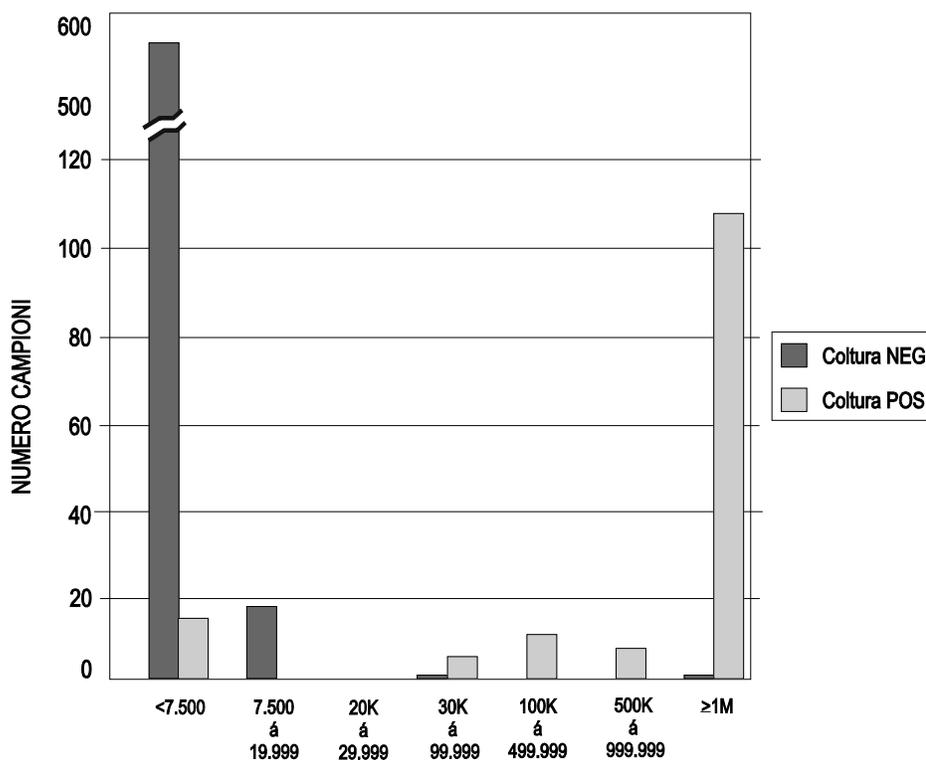
### B. Gamma dei valori ottenuti in campioni clinici

Per i 127 campioni MTD-positivi, i valori erano compresi fra 35.777 e > 2.000.000 RLU.

Per i 577 campioni MTD-negativi, i valori erano compresi fra 573 e 19.176 RLU.

La distribuzione frequenziale dei risultati in RLU per tutti questi campioni, dopo risoluzione delle discordanze, è di seguito indicata: la risoluzione delle discordanze si basa sull'analisi di altri campioni, positivi alla coltura, provenienti da uno stesso paziente e/o sulla diagnosi finale del medico curante.

**Tabella dei risultati ottenuti da campioni  
provenienti da pazienti non trattati (7 siti)  
N=704**



**Risultati della coltura**

<i>M. tuberculosis</i> NEG	554	19	0	1	0	0	1
<i>M. tuberculosis</i> POS	13	0	0	4	7	6	108

## PERFORMANCE

### A. Valutazione clinica

Le performance del test MTD nella sua forma originale sono state valutate durante delle prove cliniche condotte in sei laboratori confrontando i risultati ottenuti mediante vetrino con i risultati della coltura su 6.079 campioni provenienti da 2.609 pazienti. Di questi campioni, 4.000 provenivano da 1.898 pazienti che non erano sottoposti ad un trattamento anti-tubercolare. I sei laboratori rappresentavano zone geografiche diverse: cinque nosocomi di grandi città statunitensi che disponevano di un reparto specializzato per la tubercolosi e un laboratorio pubblico.

Le performance del test MTD nella sua forma attuale sono state valutate su sette laboratori, mettendo a confronto i risultati del test MTD con i risultati della coltura. I sette laboratori che partecipavano al test rappresentavano zone geografiche diverse: sei presidi ospedalieri di grandi città statunitensi che disponevano di un reparto specializzato per la tubercolosi e un laboratorio pubblico nazionale di micobatteriologia.

I campioni saggiati provenivano da pazienti che non erano sottoposti a trattamento anti-tubercolare. 132 hanno evidenziato risultati positivi in coltura per i micobatteri dell'*M. tuberculosis* complex. Il test MTD ha identificato 119 di questi campioni di coltura positivi; 7 campioni contenevano micobatteri non tubercolari oltre a *M. tuberculosis*.

**CAMPIONI  
PROVENIENTI DA PAZIENTI NON TRATTATI**

**Confronto MTD / coltura (N=704)**

<b>PER PAZIENTE</b> (prima della risoluzione delle discordanze)		
Coltura	+	-
<b>MTD +</b>	54	4
<b>MTD -</b>	4	221

<b>PER PAZIENTE</b> (dopo risoluzione delle discordanze)		
Coltura	+	-
<b>MTD +</b>	56	2
<b>MTD -</b>	4	221

<b>PER CAMPIONE</b> (prima della risoluzione delle discordanze)		
Coltura	+	-
<b>MTD +</b>	119	8
<b>MTD -</b>	13	564

<b>PER CAMPIONE</b> (dopo risoluzione delle discordanze)		
Coltura	+	-
<b>MTD +</b>	125	2
<b>MTD -</b>	13	564

I pazienti con sospetta tubercolosi polmonare attiva e non sottoposti a trattamento sono stati inclusi in questo studio. La prevalenza totale dei pazienti che hanno evidenziato una coltura positiva al *M. tuberculosis* era del 20,5%.

Sono state determinate, per ogni paziente, una sensibilità media del 93,3% e una specificità media del 99,1% rispetto alla coltura. Per ogni campione sono state rilevate una sensibilità media del 90,6% e una specificità media del 99,6% rispetto alla coltura. La tabella sottoindicata mostra la sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo (VPP) e il valore predittivo negativo (VPN) con intervalli di confidenza del 95% per le stime di performance. Tutti i dati riportati sono quelli ottenuti dopo risoluzione delle discordanze basata sull'analisi di altri campioni, positivi e negativi in coltura, provenienti dallo stesso paziente e/o sulla diagnosi finale del medico curante.

**Per paziente:**

	Percentuale media	Numero / Totale	Intervallo di confidenza del 95%
Sensibilità	93,3%	56/60	83,8 – 98,2%
Specificità	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%

	Percentuale media	Numero / Totale	Intervallo di confidenza del 95%
Sensibilità	90,6%	125/138	84,4 – 94,9%
Specificità	99,6%	564/566	98,7 – 100%

	Percentuale media	Numero / Totale	Intervallo di confidenza dell 95%
VPP	98,4%	125/127	94,4 – 99,8%
VPN	97,7%	564/577	96,2 – 98,8%

Sui 564 campioni negativi sia alla cultura che con l'MTD per i micobatteri del *M. tuberculosis* complex, 114 campioni erano risultati positivi per i MOTT alla coltura, 64 provenivano da pazienti per i quali in altri campioni erano stati isolati con la coltura dei MOTT e 169 provenivano da pazienti in cui con l'esame colturale non era stato isolato alcun micobatterio.

## B. Precisione

Sono stati testati, in tre laboratori, pannelli di campioni composti da 2 campioni negativi, 2 campioni scarsamente positivi (<sup>a</sup> 100 CFU/ test) e 2 campioni moderatamente positivi (<sup>a</sup> 1000 CFU/ test). I campioni positivi sono stati preparati aggiungendo quantità note di *M. tuberculosis* a un pool di campioni moderatamente inibitori. I campioni, così come i controlli di amplificazione positivo e negativo, sono stati testati sui tre laboratori, in triplo cieco, due volte al giorno per 3 giorni.

La variabilità dei risultati non è risultata significativa tra un laboratorio e l'altro o da un giorno all'altro e quindi i risultati dei tre laboratori hanno potuto essere consolidati e presentati come di seguito indicato. I valori misurati in RLU sono limitati dalla risoluzione del fotomoltiplicatore del luminometro. Per questa ragione i valori superiori a 2.000.000 RLU vengono riportati a 2.000.000 RLU. Non vengono indicati né le deviazioni standard, né i coefficienti di variazione.

Precisione				
	Numero di osservazioni	% di risultati corretti	Range (RLU)	Media (RLU)
<b>Campioni 1: Fortemente positivi</b>	108	100%	154.103 - >2.000.000	>2.000.000
<b>Campioni 2: Debolmente positivi</b>	108	99,1%	16.324 - >2.000.000*	>2.000.000
<b>Campioni 3: Negativi</b>	108	100%	2.004 - 5.693	2.689
<b>Controllo positivo</b>	54	100%	>2.000.000	>2.000.000
<b>Controllo negativo</b>	54	100%	2.272 - 4.241	2.944

\*Un risultato negativo registrato.

## C. Riproducibilità

Lo studio di riproducibilità è stato effettuato saggiando 25 campioni, con controlli di amplificazione negativi intercalati fra ogni campione, per formare un totale di 50 campioni. Il pannello di riproducibilità è stato testato in quattro laboratori.

In totale, il 100% (120/120) dei campioni negativi e il 98,8% (79/80) dei campioni positivi hanno dato i risultati attesi.

#### D. Specificità analitica

La specificità del test MTD è stata valutata utilizzando batteri, funghi e virus. Nel caso dei batteri e dei funghi, i test di specificità hanno riguardato 160 ceppi (151 specie provenienti da 62 generi) di micobatteri molto vicini al *M. tuberculosis*, altri microrganismi responsabili di patologie respiratorie e un pannello filogenetico di microrganismi della flora commensale dell'apparato respiratorio. I ceppi tipo erano colture ATCC (American Type Culture Collection) e 5 ceppi erano stati forniti da laboratori di analisi. I lisati, preparati a partire da colture in fase attiva di crescita (o, in tre casi, da rRNA) sono stati analizzati seguendo il protocollo del test MTD, a circa  $5 \times 10^7$  CFU per test. Soltanto i ceppi del *M. tuberculosis* complex hanno fornito risultati positivi, con l'eccezione dei ceppi di *M. celatum* e *M. terrae-like*.

A concentrazioni superiori a 30 CFU per test, i ceppi di *M. celatum* e alcuni ceppi di *M. terrae-like* hanno dato risultati positivi (26.772 RLU per *M. celatum* e tra 19.470 e 49.976 RLU per *M. terrae-like*).

#### E. Limite di identificazione

Trenta ceppi di *M. tuberculosis* provenienti da regioni geografiche molto diverse, compresi quelli rappresentanti di ceppi resistenti e di ceppi sensibili agli antibiotici, sono stati identificati dal test MTD. Il test MTD ha potuto identificare fino a 1 CFU per test di ognuno dei 30 ceppi.

#### F. Test di sovraccarico

È stato testato l'rRNA di *Mycobacterium tuberculosis* ad una concentrazione di 25 fg (equivalente a 5 CFU per test) in presenza di circa 540.000 CFU per test (450 µl) dei seguenti organismi non bersaglio: *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* e *Rhodococcus bronchialis*. Tutti i risultati sono stati positivi per l'rRNA del *M. tuberculosis* in presenza di questi organismi non bersaglio che non hanno quindi originato alcun tipo di interferenza.

## RISOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI

OSSERVAZIONE	POSSIBILI CAUSE	AZIONI CONSIGLIATE
Valori elevati per il Controllo Negativo di Amplificazione o per il Controllo del Trattamento del Campione Negativo (≥ 20.000 RLU)	Omogeneizzazione insufficiente dopo aggiunta del Reagente di Selezione (S) o insufficiente volume del Reagente di Selezione.	Ripetere l'omogeneizzazione in maniera corretta. Rispettare scrupolosamente i volumi indicati. Verificare che dopo aver agitato con il vortex la soluzione assuma un colore rosa uniforme.
	Amplificazione di contaminanti introdotti per mancanza di precauzioni durante la preparazione delle reazioni.	La distribuzione dei reagenti con le pipette deve essere eseguita con la massima accuratezza. Le provette devono essere decontaminate con una soluzione di candeggina diluita 1:10, come indicato nel paragrafo « PROCEDIMENTO ». I banchi, gli incubatori, il bagno-maria e le pipette devono essere decontaminati con una soluzione di candeggina diluita 1:2, come indicato nel paragrafo « PROCEDIMENTO »
	Omissione della fase di raffreddamento di 5 minuti.	
	Contaminazione del laboratorio o dei reagenti.	
Valori bassi per il Controllo Negativo di Amplificazione o per il Controllo del Trattamento del Campione Negativo (< 500.000 RLU)	Omissione dell'asciugatura delle provette prima della lettura con il luminometro.	
	Mancato rispetto delle temperature raccomandate durante la fase di amplificazione.	Le provette devono essere asciugate con carta assorbente inumidita, priva di lanugine, prima della lettura con il luminometro.
	Aggiunta del Reagente di Amplificazione dispensando il reattivo sulle pareti della provetta e non direttamente sul fondo della stessa.	Verificare la temperatura del bagnomaria e/o dell'incubatore e regolarla, se necessario, per rispettare le temperature raccomandate.
	Omogeneizzazione insufficiente dopo aggiunta del Reagente di Ibridazione ricostituito.	Vortexare con cura, come specificato (vedere il punto 2 del paragrafo Ibridazione). Verificare che dopo aver agitato con il vortex la soluzione assuma un colore giallo uniforme.
	Volume eccessivo del Reagente di Selezione.	Verificare la regolazione del volume della pipetta. Aver cura che, durante la fase di Selezione, l'incubazione a 60°C duri 15 minuti.
	Inosservanza del tempo prestabilito per la fase di Selezione.	
	La temperatura delle provette è scesa sotto i 42°C dopo l'incubazione a 95°C.	Trasportare direttamente le provette dall'incubatore a 95°C al bagno-maria / incubatore a 42°C.
I tubi che portano il Reagente di Rivelazione sono otturati.	Lavare i tubi con acqua calda come indicato nel Manuale d'Uso dello strumento.	

**NOTE**

- A. Gli incubatori devono avere alloggiamenti adeguati per le provette da 12 x 75 mm. Si raccomanda l'impiego degli incubatori .
- B. Per la conservazione ed il congelamento in aliquote sono raccomandate le provette per microcentrifuga con tappo a vite. Le aliquote congelate possono subire un unico ciclo di congelamento/scongelamento. Non utilizzare congelatori con sbrinamento automatico.
- C. Per lo stoccaggio delle aliquote congelate, si raccomanda di impiegare flaconi per la refrigerazione da 5 ml. Le aliquote congelate possono essere scongelate soltanto una volta. Non utilizzare congelatori a sbrinamento automatico.
- D. Dato che vi sono differenze tra i diversi Vortex e che possono essere impostate velocità diverse, può essere necessario allungare il tempo di agitazione. Impostare la velocità dell'apparecchio seguendo le istruzioni del " PROCEDIMENTO, paragrafo E " per far sì che la miscela di reazione raggiunga la parte superiore della parete della provetta. La precisione dei risultati dipende in gran parte da un'omogeneizzazione ottimale. I tempi di agitazione possono arrivare a 15 secondi senza compromettere i risultati.

## 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 acridinim- 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 92121USA



**Assistenza clienti:** +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)  
customersupport@hologic.com

**Assistenza tecnica:** +1 888 484 4747  
molecularsupport@hologic.com

Per ulteriori informazioni di contatto visitare il sito [www.hologic.com](http://www.hologic.com).

Hologic e Amplified MTD sono marchi commerciali e/o marchi commerciali registrati di Hologic, Inc. e/o delle aziende consociate negli Stati Uniti e/o in altri paesi.

Tutti gli altri marchi commerciali che possono apparire in questo foglietto illustrativo appartengono ai rispettivi proprietari.



**Emergo Europe**  
Prinsessegracht 20  
2514 AP The Hague  
The Netherlands

AW-12601-701 Rev. 002 (IT)  
©1995 - 2017 Hologic, Inc. Tutti i diritti riservati.  
2017-07