

## **cobas<sup>®</sup> MTB-RIF/INH**

### **Test degli acidi nucleici per l'uso sui cobas<sup>®</sup> 5800/6800/8800 Systems**

Per uso diagnostico *in vitro*

**cobas<sup>®</sup> MTB-RIF/INH**

P/N: 09040617190

**Per l'utilizzo sul sistema cobas<sup>®</sup> 5800**

**cobas<sup>®</sup> MTB-RIF/INH Positive Control Kit**

P/N: 09040625190

**cobas<sup>®</sup> Buffer Negative Control Kit**

P/N: 09051953190

**Per l'utilizzo sui sistemi cobas<sup>®</sup> 6800/8800**

**cobas<sup>®</sup> MTB-RIF/INH Positive Control Kit**

P/N: 07833342190 oppure

P/N: 09040625190

**cobas<sup>®</sup> Buffer Negative Control Kit**

P/N: 07002238190 oppure

P/N: 09051953190

# Indice generale

<b>Uso previsto .....</b>	<b>4</b>
<b>Riassunto e spiegazione del test.....</b>	<b>4</b>
<b>Reagenti e materiali .....</b>	<b>8</b>
Reagenti e controlli cobas® MTB-RIF/INH .....	8
Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni.....	10
Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti.....	11
Requisiti per la manipolazione dei reagenti per il cobas® 5800 System .....	11
Requisiti per la manipolazione dei reagenti per i cobas® 6800/8800 Systems .....	12
Altri materiali necessari per il cobas® 5800 System .....	13
Altri materiali richiesti per i cobas® 6800/8800 Systems.....	13
Strumentazione e software necessari .....	14
<b>Precauzioni e requisiti per l'uso.....</b>	<b>15</b>
Avvertenze e precauzioni .....	15
Manipolazione dei reagenti.....	16
Buone pratiche di laboratorio.....	16
<b>Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni .....</b>	<b>17</b>
Campione .....	17
Trasporto e conservazione dei campioni .....	17
Conservazione dei campioni inattivati.....	17
<b>Istruzioni per l'uso.....</b>	<b>18</b>
Note sulla procedura.....	18
Trattamento dei campioni di espettato grezzo .....	21
Trattamento dei sedimenti di espettato e di BAL .....	21
Sonicazione dei campioni.....	22
Esecuzione del test cobas® MTB-RIF/INH sul cobas® 5800 System .....	23
Esecuzione del test cobas® MTB-RIF/INH sui cobas® 6800/8800 Systems .....	25
<b>Risultati .....</b>	<b>27</b>
Controllo di qualità e validità dei risultati sul cobas® 5800 System .....	27
Risultati dei controlli sul cobas® 5800 System.....	27

Controllo di qualità e validità dei risultati sui <b>cobas</b> ® 6800/8800 Systems .....	27
Interpretazione dei risultati .....	28
Interpretazione dei risultati sul <b>cobas</b> ® 5800 System.....	30
Interpretazione dei risultati sui <b>cobas</b> ® 6800/8800 Systems .....	31
Limiti della procedura .....	32
<b>Valutazione delle prestazioni .....</b>	<b>35</b>
Caratteristiche delle prestazioni chiave sui <b>cobas</b> ® 6800/8800 Systems .....	35
Inattivazione del campione .....	35
Limite di sensibilità (LoD).....	35
Etero resistenza .....	35
Inclusività per le mutazioni associate alla resistenza .....	35
Specificità per il complesso MTB wild-type .....	36
Precisione.....	37
Specificità analitica/reattività crociata .....	38
Interferenze.....	40
Tasso globale d'errore del sistema .....	41
Contaminazione crociata.....	42
Prestazioni con i campioni clinici .....	42
Equivalenza dei sistemi/confronto tra sistemi.....	44
<b>Informazioni supplementari.....</b>	<b>45</b>
Caratteristiche specifiche del test .....	45
Simboli .....	46
Assistenza tecnica.....	47
Fabbricante.....	47
Marchi e brevetti.....	47
Copyright.....	47
Bibliografia .....	48
Revisione del documento .....	49

## Uso previsto

Il test **cobas®** MTB-RIF/INH per l'uso sui **cobas®** 5800/6800/8800 Systems è un esame diagnostico *in vitro* qualitativo e automatizzato, basato sulla reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR). Il test consente la rilevazione diretta delle mutazioni del *Mycobacterium tuberculosis* nei campioni respiratori umani, specificamente le mutazioni del gene *rpoB* associate alla resistenza alla rifampicina e le mutazioni nei geni *katG* e *inhA* associate alla resistenza all'isoniazide. Il test è destinato all'uso con campioni di espettorato grezzo e campioni di espettorato e di BAL (lavaggio broncoalveolare) trattati e decontaminati con N-acetilcisteina/NaOH che sono risultati positivi per il complesso *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) in base al test **cobas®** MTB. Il test è destinato all'uso in associazione con colture cellulari e test di suscettibilità ai farmaci e anche come test reflex, in associazione con il test **cobas®** MTB, in ausilio alla diagnosi di infezione da *M. tuberculosis* multi-resistente ai farmaci (MDR-TB).

## Riassunto e spiegazione del test

### Premessa

La tubercolosi è un'infezione batterica causata dal complesso *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). La tubercolosi non è soltanto uno dei più grandi problemi sanitari a livello globale, ma è anche una delle principali cause di decessi per malattie infettive nel mondo.<sup>1</sup> L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato 9,9 milioni di nuove infezioni tubercolari e 1,5 milioni di decessi nel 2020.<sup>1</sup>

Il complesso *M. tuberculosis* è costituito da un gruppo di specie strettamente correlate, appartenenti al genere *Mycobacterium*, che causano l'infezione negli esseri umani e negli animali: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin), *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. suricattae*, *M. orygis*, *Dassie bacillus* e *Chimpanzee bacillus*. Tutti i componenti del complesso MTB possono causare la tubercolosi, tuttavia il più comune è il bacillo *M. tuberculosis*. La patologia più frequente è l'infezione polmonare, benché il complesso MTB possa causare anche l'infezione extra-polmonare, che si riscontra prevalentemente nei bambini. *M. bovis* è la causa della tubercolosi nel 2,8% dei pazienti in vari contesti geografici.<sup>2</sup> Gli altri bacilli del complesso MTB, a parte *M. bovis* e *M. tuberculosis*, causano più raramente le infezioni negli esseri umani. Il bacillo *M. africanum* è associato alla tubercolosi nei paesi dell'Africa occidentale, il bacillo *M. canetti* è diffuso nel Corno d'Africa e il bacillo *M. orygis* è causa di tubercolosi negli esseri umani e negli animali dall'Africa fino all'Asia meridionale. Il bacillo *M. caprae* è considerato una sottospecie di *M. bovis*. Il bacillo *M. microti* colpisce principalmente i roditori, mentre *M. pinnipedii* causa la malattia nelle foche e *M. suricattae* causa la tubercolosi nei suricati in Sud Africa. Il bacillo *M. mungi* è stato identificato come causa della malattia tubercolare nella mangusta striata.<sup>3</sup>

La tubercolosi si diffonde da persona a persona attraverso le goccioline delle secrezioni respiratorie. La maggior parte delle persone infette da *M. tuberculosis* non manifesta sintomi e non sviluppa la malattia dopo l'infezione primaria. Questa fase è definita infezione tubercolare latente. L'infezione latente può durare anche decenni e, nella maggioranza dei casi, non evolve mai in una patologia clinica. In alcuni soggetti, tuttavia, il bacillo prevale sul sistema immunitario causando una progressione dell'infezione tubercolare latente in tubercolosi attiva. Di solito questo accade nei due anni successivi all'infezione oppure dopo un lungo periodo di latenza. Complessivamente i soggetti con infezione latente corrono un rischio del 5-10% di sviluppare la malattia tubercolare, anche se la percentuale di rischio varia in base a diversi fattori e aumenta in modo sostanziale in caso di immunosoppressione, ad esempio quando il soggetto è in terapia con "farmaci biologici"<sup>4</sup> (inibitori del TNF) o ha un'infezione da HIV.<sup>5,6</sup> I soggetti con TB polmonare attiva possono diffondere

goccioline di saliva tossendo, parlando o nel corso di procedure mediche. I soggetti con infezione polmonare attiva sono considerati estremamente contagiosi, pertanto la diagnosi è indispensabile.

La diagnosi di TB attiva si basa su sospetti/riscontri clinici, oltre che su esami radiografici e di laboratorio. È possibile che i pazienti debbano fornire campioni respiratori per gli strisci dei bacilli acido-resistenti (*Acid-Fast Bacteria*, AFB) e per gli esami culturali dei micobatteri, oltre che per i test di amplificazione degli acidi nucleici (*Nucleic Acid Amplification Testing*, NAAT). È fondamentale che vengano eseguiti gli esami culturali dei micobatteri oltre ai test NAAT, in modo tale da ridurre al minimo il rischio di risultati falsi negativi e consentire lo svolgimento dei test di suscettibilità ai farmaci per i pazienti che risultano positivi.

Un ceppo TB è definito resistente ai farmaci quando è insensibile ad almeno uno dei farmaci utilizzati per il trattamento della tubercolosi. Un ceppo TB è definito multi-resistente ai farmaci (*Multidrug Resistant TB*, MDR-TB) quando è insensibile almeno ai due farmaci antitubercolari considerati più efficaci: l'isoniazide e la rifampicina. Un ceppo TB è definito estensivamente resistente ai farmaci (*Extensively Drug Resistant TB*, XDR-TB) quando presenta un'ulteriore resistenza alla rifampicina e a qualunque fluorochinolone e ad almeno uno tra i farmaci bedaquilina e linezolid. Globalmente, nel 2020 il 71% (2,1 milioni su 3 milioni) di chi ha ricevuto una diagnosi di TB polmonare batteriologicamente confermata è stato testato per la resistenza alla rifampicina. Tra i soggetti testati, sono stati notificati 132.222 casi di TB resistente alla rifampicina (*MDR/Rifampicin Resistant TB*, RR/MDR-TB) e 25.681 casi di pre-XDR-TB o XDR-TB.<sup>1</sup>

La frequenza dei casi di MDR-TB varia di regione in regione. L'incidenza dei casi di MDR-TB è più elevata tra i pazienti precedentemente sottoposti a trattamenti. La terapia antitubercolare prevede la somministrazione prolungata di un cocktail di farmaci ed è generalmente efficace. Tuttavia potrebbe essere più complicato trattare alcuni ceppi di MTB che sono resistenti ai farmaci. Il trattamento della tubercolosi multi-resistente ai farmaci (MDR-TB) richiede la somministrazione di molti farmaci di seconda linea con effetti tossici, e per periodi di tempo più lunghi rispetto alla TB sensibile ai farmaci, con probabilità di guarigione più basse.<sup>7</sup>

La diagnosi di TB può basarsi sul quadro clinico, sugli esiti degli esami radiografici e di laboratorio (tra cui strisci AFB/esami culturali di micobatteri) e sui test NAAT. Inoltre è possibile eseguire test che misurano la risposta di anticorpi o antigeni, ad esempio i test cutanei tuberculinici (*Tuberculin Skin Test*, TST) e i test di rilascio dell'interferone gamma (*Interferon-gamma (INF $\gamma$ )-Release Assay*, IGRA).<sup>8</sup> I test TST e IGRA, tuttavia, possono produrre risultati negativi in presenza di un'infezione attiva e non sono in grado di differenziare tra infezione latente e malattia attiva. La diagnosi definitiva della malattia è confermata dal recupero dell'organismo nell'esame culturale o dalla rilevazione diretta dell'acido nucleico del complesso MTB in un campione clinico. I test di suscettibilità ai farmaci (*Drug Susceptibility Testing*, DST) sono necessari per confermare la terapia empirica appropriata, ma prevedono tempi lunghi e risultati dopo diverse settimane, a seconda del metodo. In alternativa, i marcatori genetici associati alla resistenza ai farmaci possono essere rilevati direttamente nei campioni clinici o negli isolati da coltura, applicando metodiche molecolari per ottenere risultati più rapidi. Data la natura contagiosa del complesso MTB e la crescente resistenza ai farmaci, la velocità e la precisione della diagnosi sono aspetti fondamentali per poter intervenire e controllare il complesso MTB.<sup>8</sup>

## Spiegazione del test

Il test **cobas®** MTB-RIF/INH per l'uso sui **cobas®** 5800/6800/8800 Systems è un test real-time PCR qualitativo automatizzato, concepito come test reflex da eseguire in associazione con il test **cobas®** MTB per rilevare le mutazioni nel complesso *Mycobacterium tuberculosis*, più specificamente le mutazioni del gene *rpoB* associate alla resistenza alla rifampicina e le mutazioni dei geni *katG* e *inhA* associate alla resistenza all'isoniazide. Il test è destinato all'uso con campioni di espettorato grezzo e campioni di espettorato e di BAL (lavaggio broncoalveolare) trattati e decontaminati con N-acetilcisteina/NaOH che sono risultati positivi per il complesso *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) in base al test **cobas®** MTB. Il DNA wild-type del complesso MTB viene rilevato come controllo interno, per monitorare l'intero processo di preparazione dei campioni e amplificazione PCR. Il test prevede anche l'uso di un controllo positivo con titolo basso e un controllo negativo.

## Principi della procedura

Il test **cobas®** MTB-RIF/INH prevede una fase preanalitica in cui il campione viene liquefatto e il micobatterio viene reso inattivo, seguita dalle fasi di sonicazione, preparazione totalmente automatizzata del campione (estrazione e purificazione degli acidi nucleici), amplificazione PCR e rilevazione. La liquefazione del campione e l'inattivazione del micobatterio avvengono simultaneamente, durante l'incubazione del campione con **cobas®** Microbial Inactivation Solution (MIS). La sonicazione del campione liquefatto e inattivato avviene prima del caricamento sui **cobas®** 5800/6800/8800 Systems. Il **cobas®** 5800 System è progettato come strumento unico integrato. I **cobas®** 6800/8800 Systems sono costituiti dal modulo di inserimento dei campioni, dal modulo di trasferimento, dal modulo di preparazione e dal modulo analitico. La gestione automatizzata dei dati è affidata al software di **cobas®** 5800 o **cobas®** 6800/8800 Systems, che classifica i risultati del test come positivi, negativi o non validi. I risultati possono essere visualizzati direttamente sullo schermo del sistema, esportati o stampati in un report.

Gli acidi nucleici dei campioni dei pazienti e dei controlli esterni vengono estratti simultaneamente. In sintesi, l'acido nucleico batterico viene rilasciato attraverso la degradazione chimica (MIS, **cobas omni** Lysis Reagent), enzimatica (proteinasi) e fisica (sonicazione) del batterio. L'acido nucleico liberato si lega quindi alla superficie di silice delle biglie di vetro magnetiche aggiunte. Le sostanze che non formano legami e le impurità (ad esempio le proteine denaturate, i detriti cellulari e i potenziali inibitori della PCR) vengono rimosse nei successivi lavaggi, mentre l'acido nucleico purificato viene sottoposto ad eluizione dalle biglie di vetro magnetiche utilizzando il tampone di eluizione a temperature elevate.

Per l'amplificazione selettiva e la rilevazione dell'acido nucleico target nel campione vengono utilizzati i primer forward e reverse specifici del gene target. Un solo set di primer e alcune sonde mutazione-specifiche consentono di rilevare le 18 mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina (gene *rpoB*). Due set di primer e alcune sonde mutazione-specifiche consentono di rilevare le 7 mutazioni associate alla resistenza all'isoniazide (gene *katG* e regione del promotore del gene *inhA*). Il complesso MTB viene rilevato da un set di primer e una sonda il cui target è una sequenza genomica a copia singola ben conservata del complesso MTB. Per l'amplificazione PCR viene utilizzato un enzima DNA polimerasi termostabile. Le sequenze target vengono amplificate simultaneamente utilizzando un profilo di amplificazione PCR universale, con valori predefiniti per gli incrementi della temperatura e il numero dei cicli. La soluzione Master Mix contiene trifosfato di deossiuridina (dUTP) anziché trifosfato di deossitimidina (dTTP), che è incorporato nel DNA appena sintetizzato (amplicone). Tutti gli ampliconi contaminanti che sono stati prodotti da sessioni di PCR precedenti vengono eliminati durante il primo passaggio del ciclo termico dall'enzima AmpErase, contenuto nella Master Mix per PCR.<sup>9</sup> Gli ampliconi che si sono appena formati non vengono invece eliminati perché l'enzima AmpErase si inattiva dopo l'esposizione a temperature superiori a 55°C.

La soluzione Master Mix **cobas®** MTB-RIF/INH contiene varie sonde mutazioni-specifiche (associate alla resistenza alla rifampicina e alla resistenza all'isoniazide) e una sonda specifica per il complesso MTB. Le sonde sono marcate con fluorocromi reporter target-specifici, i quali consentono di rilevare simultaneamente le mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina, le mutazioni associate alla resistenza all'isoniazide e il complesso MTB target in cinque diversi canali target (le mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina vengono rilevate in tre dei cinque canali di rilevazione).<sup>10, 11</sup> Quando non è legato alla sequenza target, il segnale fluorescente delle sonde intatte viene soppresso dal fluorocromo quencher. Nella fase di amplificazione PCR, l'ibridizzazione delle sonde con lo stampo specifico di DNA a filamento unico determina la scissione della sonda ad opera dell'attività esonucleasica 5'→3' della DNA polimerasi, con la conseguente separazione dei fluorocromi reporter e quencher e la generazione di un segnale fluorescente. Ad ogni ciclo di PCR vengono generate quantità crescenti di sonde scisse e, in concomitanza, il segnale cumulativo del fluorocromo reporter aumenta. La rilevazione real-time e la discriminazione dei prodotti della PCR sono possibili grazie alla misurazione della fluorescenza dei fluorocromi reporter liberati, rispettivamente, dalle mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina, dalle mutazioni associate alla resistenza all'isoniazide e dal complesso MTB target.

# Reagenti e materiali

## Reagenti e controlli cobas® MTB-RIF/INH

I materiali forniti per il test cobas® MTB-RIF/INH sono elencati nella Tabella 1. Tutti i reagenti e i controlli non ancora aperti devono essere conservati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 1 alla Tabella 4. I materiali necessari ma non forniti sono elencati dalla Tabella 2 alla Tabella 4 e dalla Tabella 8 alla Tabella 9.

**Tabella 1** cobas® MTB-RIF/INH

### cobas® MTB-RIF/INH

Conservare a 2-8°C

Cassetta per 192 test (P/N 09040617190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit
<b>Soluzione proteinasi (PASE)</b>	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, cloruro di calcio, acetato di calcio, 8% proteinasi, glicerolo  EUH210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. EUH208: Contiene subtilisina da <i>Bacillus subtilis</i> . Può provocare una reazione allergica.	22,3 ml
<b>Diluente generico per campioni (GSD)</b>	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% costrutto di RNA non correlato a MTB, 0,002% Poly rA RNA (sintetico), < 0,1% sodio azide	21,2 ml
<b>Tampone di eluizione (EB)</b>	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	21,2 ml
<b>Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)</b>	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	7,5 ml
<b>MTB-RIF/INH Master Mix Reagente 2 (MTB-RIF/INH MMX-R2)</b>	Tampone tricina, acetato di potassio, EDTA, glicerolo, 18% dimetilsolfossido, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP e dUTP, < 0,1% Tween 20, < 0,1% sodio azide, < 0,1% DNA polimerasi Z05, < 0,1% enzima AmpErase (uracil-N glicosilasi) (batterico), < 0,01% primer upstream e downstream, < 0,01% sonde oligonucleotidiche fluorescenti specifiche per le mutazioni associate alla resistenza RIF e alla resistenza all'isoniazide e per il complesso MTB, < 0,01% aptamero oligonucleotidico	9,7 ml

**Tabella 2** cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit**cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit**

Conservare a 2-8°C

Per l'utilizzo sul sistema **cobas®** 5800 (P/N 09040625190)Per l'utilizzo sui sistemi **cobas®** 6800/8800 (P/N 07833342190 o P/N 09040625190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit
<b>Controllo positivo MTB-RIF/INH (MTB-RIF/INH (+) C)</b>	Tampone Tris, < 0,05% sodio azide, < 0,05% EDTA, 0,002% Poly rA, < 0,01% DNA plasmidico non infettivo (batterico) contenente le sequenze genomiche di <i>M. tuberculosis</i> (16S, gene <i>rpoB</i> mutato e regione del promotore del gene <i>inhA</i> mutato)	16 ml (16 × 1 ml)

**Tabella 3** cobas® Buffer Negative Control Kit**cobas® Buffer Negative Control Kit**

Conservare a 2-8°C

Per l'utilizzo sul sistema **cobas®** 5800 (P/N 09051953190)Per l'utilizzo sui sistemi **cobas®** 6800/8800 (P/N 07002238190 o P/N 09051953190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit
<b>cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)</b>	Tampone Tris, < 0,1% sodio azide, EDTA, 0,002% Poly rA RNA (sintetico)	16 ml (16 × 1 ml)

## Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni

Tabella 4 Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni\*

Reagenti	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento**
<b>cobas omni MGP Reagent (MGP)</b> Conservare a 2-8°C (P/N 06997546190)	Biglie di vetro magnetiche, tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	480 test	Non applicabile
<b>cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL)</b> Conservare a 2-8°C (P/N 06997511190)	Tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	4 × 875 ml	Non applicabile
<b>cobas omni Lysis Reagent (LYS)</b> Conservare a 2-8°C (P/N 06997538190)	43% (p/p) guanidina tiocianato***, 5% (p/v) polidocanolo***, 2% (p/v) ditiotreitolo***, citrato di sodio diidrato	4 × 875 ml	<p><b>PERICOLO</b></p> <p>H302: Nocivo per ingestione.  H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.  H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.  EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici.  EUH071: Corrosivo per le vie respiratorie.  P273: Non disperdere nell'ambiente.  P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/protizzare gli occhi/protizzare il viso/protizzare l'udito.  P303 + P361 + P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle.  P304 + P340 + P310: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIPOISON/un medico.  P305 + P351 + P338 + P310: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIPOISON/un medico.  P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito.  593-84-0 Tiocianato di guanidinio  9002-92-0 Polidocanolo  3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo</p>
<b>cobas omni Wash Reagent (WASH)</b> Conservare a 15-30°C (P/N 06997503190)	Citrato di sodio diidrato, 0,1% metil-4 idrossibenzoato	4,2 l	Non applicabile

\* Questi reagenti non sono inclusi nel kit cobas® MTB-RIF/INH. Consultare l'elenco degli altri materiali richiesti (dalla Tabella 8 alla Tabella 10).

\*\* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea

\*\*\* Sostanza pericolosa

## Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti

I reagenti devono essere conservati e manipolati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 5, Tabella 6 alla Tabella 7.

I reagenti che non sono ancora stati caricati sul **cobas®** 5800 System o sui **cobas®** 6800/8800 Systems devono essere conservati alla temperatura indicata nella Tabella 5.

**Tabella 5** Conservazione dei reagenti (non ancora caricati sul sistema)

Reagente	Temperatura di conservazione
<b>cobas®</b> MTB-RIF/INH	2-8°C
<b>cobas®</b> MTB-RIF/INH Positive Control Kit	2-8°C
<b>cobas®</b> Buffer Negative Control Kit	2-8°C
<b>cobas omni</b> Lysis Reagent	2-8°C
<b>cobas omni</b> MGP Reagent	2-8°C
<b>cobas omni</b> Specimen Diluent	2-8°C
<b>cobas omni</b> Wash Reagent	15-30°C

## Requisiti per la manipolazione dei reagenti per il **cobas® 5800 System**

Dopo il caricamento sul **cobas®** 5800 System, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. Il sistema consente l'utilizzo dei reagenti soltanto se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 6. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. Tabella 6 Nella vengono fornite all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per il **cobas®** 5800 System.

**Tabella 6** Scadenza dei reagenti sul **cobas®** 5800 System

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo
<b>cobas®</b> MTB-RIF/INH	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 36 giorni <sup>b</sup>
<b>cobas®</b> MTB-RIF/INH Positive Control Kit	Data non superata	Non applicabile <sup>a</sup>	Non applicabile	Max 36 giorni <sup>b</sup>
<b>cobas®</b> Buffer Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile <sup>a</sup>	Non applicabile	Max 36 giorni <sup>b</sup>
<b>cobas omni</b> Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento <sup>b</sup>	Non applicabile	Non applicabile
<b>cobas omni</b> MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento <sup>b</sup>	Non applicabile	Non applicabile
<b>cobas omni</b> Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento <sup>b</sup>	Non applicabile	Non applicabile
<b>cobas omni</b> Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento <sup>b</sup>	Non applicabile	Non applicabile

<sup>a</sup> Reagenti monouso

<sup>b</sup> Il calcolo inizia dalla prima volta che il reagente viene caricato sul **cobas®** 5800 System.

## Requisiti per la manipolazione dei reagenti per i cobas® 6800/8800 Systems

Dopo il caricamento sui **cobas® 6800/8800 Systems**, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. I **cobas® 6800/8800 Systems** consentono l'uso dei reagenti solo se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 7. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. La Tabella 7 fornisce all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per i **cobas® 6800/8800 Systems**.

**Tabella 7** Scadenza dei reagenti sui **cobas® 6800/8800 Systems**

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo (tempo cumulativo a bordo fuori dal frigorifero)
<b>cobas® MTB-RIF/INH</b>	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 40 ore
<b>cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit</b>	Data non superata	Non applicabile <sup>a</sup>	Non applicabile	Max 10 ore
<b>cobas® Buffer Negative Control Kit</b>	Data non superata	Non applicabile <sup>a</sup>	Non applicabile	Max 10 ore
<b>cobas omni</b> Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento <sup>b</sup>	Non applicabile	Non applicabile
<b>cobas omni</b> MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento <sup>b</sup>	Non applicabile	Non applicabile
<b>cobas omni</b> Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento <sup>b</sup>	Non applicabile	Non applicabile
<b>cobas omni</b> Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento <sup>b</sup>	Non applicabile	Non applicabile

<sup>a</sup> Reagenti monouso

<sup>b</sup> Il calcolo inizia da quando il reagente viene caricato per la prima volta sui **cobas® 6800/8800 Systems**.

## Altri materiali necessari per il cobas® 5800 System

**Tabella 8** Materiali e consumabili per l'utilizzo sul cobas® 5800 System

Materiale	P/N
<b>cobas omni</b> Processing Plate 24	08413975001
<b>cobas omni</b> Amplification Plate 24	08499853001
<b>cobas omni</b> Liquid Waste Plate 24	08413983001
Puntale CORE TIPS con filtro, 1 ml	04639642001
Puntale CORE TIPS con filtro, 300 µl	07345607001
<b>cobas omni</b> Liquid Waste Container	07094388001
<b>cobas omni</b> Lysis Reagent	06997538190
<b>cobas omni</b> MGP Reagent	06997546190
<b>cobas omni</b> Specimen Diluent	06997511190
<b>cobas omni</b> Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto	07435967001 oppure 08030073001

## Altri materiali richiesti per i cobas® 6800/8800 Systems

**Tabella 9** Materiali e consumabili per l'uso sui cobas® 6800/8800 Systems

Materiale	P/N
<b>cobas omni</b> Processing Plate	05534917001
<b>cobas omni</b> Amplification Plate	05534941001
<b>cobas omni</b> Pipette Tips	05534925001
<b>cobas omni</b> Liquid Waste Container	07094388001
<b>cobas omni</b> Lysis Reagent	06997538190
<b>cobas omni</b> MGP Reagent	06997546190
<b>cobas omni</b> Specimen Diluent	06997511190
<b>cobas omni</b> Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi e Contenitore per rifiuti solidi oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto e Kit di aggiornamento del cassetto per rifiuti solidi	07435967001 e 07094361001 oppure 08030073001 e 08387281001

**Tabella 10** Altri materiali e consumabili necessari per il flusso di lavoro preanalitico

Materiali
cobas® Microbial Inactivation Solution (P/N 08185476001)
Sonicatore per provette TS 5 (Rinco Ultrasonics AG - P/N 46690)
Provette da 5 ml in polipropilene, 75 x 13 mm, tappo a vite, fondo tondo (provetta Sarstedt - P/N 60.504.010, tappo P/N 65.163)*
RACK MPA 13 MM LIGHT GREEN 7001-7050 (Roche - P/N 03118878001 o equivalente)**
Centrifuga (con opzione per limitare RCF a max 3000 x g, compatibile con provette 75 x 13 mm con tappo a vite)
Miscelatore Vortex
Etichette barcode termostabili (OPAL Associates AG, P/N 20300824 TTR PE-Folie Pharma o equivalente)***

- \* L'uso di provette diverse da quelle raccomandate deve essere validato dall'utente prima dell'implementazione nel flusso di lavoro cobas® MTB-RIF/INH nel laboratorio.
- \*\* I rack MPA da 13 mm sono indispensabili per poter utilizzare il sonicatore per provette TS 5. Contattare il rappresentante Roche locale per richiedere un listino dettagliato dei rack per campioni equivalenti, in altri colori o intervalli numerici. Importante: i rack RD5 non sono compatibili con il sonicatore per provette TS 5.
- \*\*\* Per ulteriori dettagli sulle specifiche dei barcode, fare riferimento all'Assistenza Utente e/o alla Guida Utente dei cobas® 5800/6800/8800 Systems in uso. L'uso di etichette barcode diverse da quelle raccomandate deve essere validato dall'utente prima dell'implementazione nel flusso di lavoro cobas® MTB-RIF/INH nel laboratorio. Contattare il rappresentante Roche di zona per ulteriori dettagli sulle etichette barcode compatibili e per suggerimenti sulla verifica della compatibilità. L'uso di etichette barcode non compatibili potrebbe causare danni alle provette durante la sonicazione e la successiva contaminazione dello strumento.

## Strumentazione e software necessari

Il software cobas® 6800/8800 e il pacchetto di analisi cobas® MTB-RIF/INH per il cobas® 5800 System devono essere installati sugli strumenti cobas® 5800. Il software Data Manager e il PC per il cobas® 5800 System verranno forniti con il sistema.

Il software dei cobas® 6800/8800 Systems e il pacchetto di analisi cobas® MTB-RIF/INH per i cobas® 6800/8800 Systems devono essere installati sugli strumenti cobas® 6800/8800. Il server IG (Instrument Gateway) verrà fornito con il sistema.

**Tabella 11** Strumentazione

Apparecchiatura	P/N
cobas® 5800 System	08707464001
cobas® 6800 System (opzione mobile)	06379672001
cobas® 6800 System (fisso)	05524245001
cobas® 8800 System	05412722001
Modulo di inserimento dei campioni	06301037001

Per ulteriori informazioni, consultare l'Assistenza Utente o le Guide per l'utente del cobas® 5800 System o dei cobas® 6800/8800 Systems.

# Precauzioni e requisiti per l'uso

## Avvertenze e precauzioni

Come richiesto per qualsiasi procedura di analisi, per lo svolgimento di questo test è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio. Data l'elevata sensibilità di questo test, fare attenzione ad evitare la contaminazione dei reagenti e delle miscele di amplificazione.

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Tutti i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi. Di conseguenza, tutti i campioni biologici dovrebbero essere manipolati come se fossero infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio, dopo una valutazione adeguata dei rischi, come descritto in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, nel documento M29-A4 del CLSI e nel Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual dell'OMS.<sup>12-14</sup> Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test cobas® MTB-RIF/INH e dei cobas® 5800/6800/8800 Systems.
- Tutto il personale deve indossare un dispositivo di protezione individuale che comprenda camice da laboratorio, guanti monouso e protezioni per gli occhi e le vie respiratorie e deve attenersi alle pratiche e alle procedure di sicurezza previste dal proprio ente, anche per quanto riguarda la manipolazione di sostanze chimiche e campioni biologici.
- La liquefazione del campione e l'inattivazione del micobatterio per azione della soluzione MIS dovrebbero svolgersi sotto una cappa di sicurezza biologica (*Biological Safety Cabinet*, BSC) all'interno di un laboratorio con livello di biosicurezza B3<sup>12</sup> secondo le linee guida o i regolamenti locali e istituzionali<sup>14</sup> e dopo un'attenta valutazione del rischio.
- Il successo della procedura di inattivazione del bacillo TB dipende dal rispetto delle procedure descritte in questo documento e dalla miscelazione completa del campione con la soluzione MIS. Il trattamento preanalitico dei campioni dei pazienti con la soluzione MIS riduce, ma potrebbe non eliminare del tutto, il rischio di infezione TB.
- Tutti i materiali di origine umana devono essere considerati a rischio biologico e quindi manipolati adottando precauzioni universalmente valide. In caso di fuoriuscita accidentale, disinfeccare immediatamente seguendo le procedure previste dall'organizzazione.
- In caso di fuoriuscita dei campioni in MIS (contenente guanidina tiocianato), evitare il contatto con i disinfettanti contenenti ipoclorito di sodio, come la candeggina. L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.
- In caso di fuoriuscita dei campioni in MIS, pulire PRIMA con acqua e un detergente da laboratorio idoneo e successivamente con etanolo al 70%.
- La soluzione MIS è sensibile alla luce e viene spedita in flaconi schermati. La soluzione MIS deve essere conservata in posizione verticale.
- Per garantire le prestazioni previste del test, utilizzare soltanto i consumabili forniti o consigliati.
- Per un corretto svolgimento del test, attenersi scrupolosamente alle procedure e alle linee guida approvate. Qualunque deviazione dalle procedure e dalle linee guida approvate potrebbe compromettere le prestazioni previste del test.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione dell'effetto carryover durante la manipolazione e la preparazione dei campioni.

- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) possono essere richieste al rappresentante Roche locale.
- In caso di un grave incidente verificatosi durante l'uso di questo test, segnalarlo alla propria autorità competente locale.

## Manipolazione dei reagenti

- Manipolare tutti i reagenti, i controlli e i campioni seguendo le buone pratiche di laboratorio, al fine di prevenire il carryover di campioni, reagenti o controlli.
- Prima dell'uso ispezionare visivamente ogni cassetta dei reagenti, del diluente, del reagente di lisi e del reagente di lavaggio per confermare l'assenza di perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.
- Il **cobas omni** Lysis Reagent e la soluzione MIS contengono guanidina tiocianato, una sostanza chimica potenzialmente pericolosa. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni.
- Evitare che il **cobas omni** Lysis Reagent e la soluzione MIS, contenenti guanidina tiocianato, entrino in contatto con la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina). L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.
- I kit di controllo usati contengono provette perforate con residui dei reagenti: prestare particolare attenzione durante lo smaltimento per evitare fuoriuscite o contatti accidentali.
- **cobas®** MTB-RIF/INH, **cobas®** MTB-RIF/INH Positive Control Kit, **cobas®** Buffer Negative Control Kit, **cobas omni** MGP Reagent e **cobas omni** Specimen Diluent contengono sodio azide come conservante. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita dei reagenti, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- Smaltire tutti i materiali entrati in contatto con i campioni e i reagenti nel rispetto dei regolamenti previsti a livello locale, nazionale e internazionale.

## Buone pratiche di laboratorio

- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro designate.
- L'inattivazione dei campioni per azione della soluzione MIS dovrebbe svolgersi sotto una cappa di sicurezza biologica (BSC) all'interno di un laboratorio con livello di biosicurezza B3<sup>12</sup> o in un altro ambiente con controllo della biosicurezza, secondo le linee guida o i regolamenti locali e istituzionali e dopo un'attenta valutazione del rischio.
- Indossare guanti, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi e le vie respiratorie durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti, nel rispetto delle procedure previste a livello istituzionale. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli. Per prevenire la contaminazione, sostituire i guanti prima e dopo aver manipolato i campioni, i kit **cobas®** MTB-RIF/INH, **cobas®** MTB-RIF/INH Positive Control Kit, **cobas®** Buffer Negative Control Kit, i reagenti **cobas omni** e i consumabili.
- Disinfettare accuratamente le mani dopo avere manipolato i campioni e i reagenti e dopo aver tolto i guanti.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio o di potassio allo 0,6% in acqua deionizzata o distillata. Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.

- In caso di fuoriuscita di liquidi sui cobas® 5800/6800/8800 Systems, pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento (o degli strumenti) seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente dei cobas® Systems in uso.

## Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

**Nota: manipolare tutti i campioni e i controlli come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.**

### Campione

Il test cobas® MTB-RIF/INH può essere eseguito sui campioni di espettorato grezzo e sui campioni di espettorato e di sedimenti di BAL trattati con NALC-NaOH.

### Trasporto e conservazione dei campioni

I campioni di espettorato grezzo possono essere conservati e/o trasportati al massimo per 3 giorni a 2-35°C, seguiti da massimo 7 giorni a 2-8°C, prima della procedura di liquefazione e inattivazione con la soluzione MIS. Per la conservazione a lungo termine dei campioni di espettorato grezzo non trattati con la soluzione MIS, le temperature consigliate sono  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .

I campioni di espettorato e di sedimenti di BAL trattati con NALC-NaOH possono essere conservati al massimo per 7 giorni a 2-8°C prima della procedura di inattivazione con la soluzione MIS. Per la conservazione a lungo termine dei sedimenti di espettorato e BAL non trattati con la soluzione MIS, è possibile congelare i campioni e conservarli a temperature  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  per 9 mesi al massimo, compresi due cicli di congelamento/scongelamento.

Per l'eventuale spedizione, imballare ed etichettare i campioni come previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni e agenti eziologici.

### Conservazione dei campioni inattivati

I campioni di espettorato grezzo, di espettorato e di sedimenti di BAL trattati con NALC-NaOH e inattivati con la soluzione MIS possono essere conservati al massimo per 12 ore a 15-35°C, seguiti da massimo 7 giorni a 2-8°C e 30 giorni a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ , inclusi due cicli di congelamento/scongelamento, prima dell'analisi sui cobas® 5800/6800/8800 Systems.

**Nota:** i campioni trattati con la soluzione MIS potrebbero non congelarsi per l'elevato contenuto di isopropanolo.

**Nota:** la sonicazione dei campioni può essere eseguita in qualsiasi momento, dopo l'incubazione iniziale con la soluzione MIS, per minimo 60 minuti. Per maggiori dettagli, fare riferimento al paragrafo "Sonicazione dei campioni".

# Istruzioni per l'uso

## Note sulla procedura

- Non utilizzare il **cobas®** MTB-RIF/INH Kit, il **cobas®** MTB-RIF/INH Positive Control Kit, il **cobas®** Buffer Negative Control Kit, la soluzione MIS o i reagenti **cobas omni** dopo la data di scadenza indicata.
- Non riutilizzare i consumabili. Sono esclusivamente monouso.
- Assicurarsi che le etichette barcode termostabili sulle provette campione siano orientate e ben visibili attraverso le fessure in alto, sul lato dei rack per campioni MPA. Per conoscere le specifiche esatte dei barcode e per ulteriori informazioni sul caricamento delle provette campione, vedere la Figura 1 e consultare la Guida Utente e/o l'Assistenza Utente dei **cobas®** 5800/6800/8800 Systems in uso.
- Verificare che le provette campione siano prive del tappo dopo la sonicazione e prima di essere caricate sui **cobas®** 5800/6800/8800 Systems.
- Per informazioni sulla corretta manutenzione degli strumenti, consultare la Guida Utente e/o l'Assistenza Utente dei **cobas®** 5800/6800/8800 Systems.

Prima di eseguire il test **cobas®** MTB-RIF/INH sui **cobas®** 5800/6800/8800 Systems, è necessario trattare i campioni attenendosi alle istruzioni contenute nei seguenti paragrafi: "Trattamento dei campioni di espettato grezzo", "Trattamento dei sedimenti di espettato e di BAL" e "Sonicazione dei campioni". I flussi di lavoro brevi per i campioni di espettato grezzo sono riportati nella Tabella 12, quelli per i sedimenti nella Tabella 13. Per ulteriori dettagli, fare riferimento ai paragrafi successivi.

**Nota:** l'inattivazione dei campioni per azione della soluzione MIS dovrebbe svolgersi sotto una cappa di sicurezza biologica (BSC) all'interno di un laboratorio con livello di biosicurezza B3<sup>12</sup> o in un altro ambiente con controllo della biosicurezza, secondo le linee guida<sup>14</sup> o i regolamenti locali e istituzionali e dopo un'attenta valutazione del rischio.

**Nota:** la sonicazione dei campioni trattati con la soluzione MIS può avvenire all'interno di un laboratorio BSL2 o in un altro ambiente con controllo della biosicurezza, nel rispetto delle linee guida e dei regolamenti a livello istituzionale e locale.

**Tabella 12** Flusso di lavoro per i campioni di espettato grezzo

BSL-3 (BSC)	1		<b>2:1</b>		Aggiungere 2 parti di soluzione MIS a 1 parte di espettato grezzo
	2		30-60 secondi		Agitare vigorosamente o usare un miscelatore vortex per 30-60 secondi
	3		≥ 60 minuti		Incubare il campione per almeno 60 minuti a 15-30°C (temperatura ambiente)
	4		30-60 secondi		Agitare vigorosamente o usare un miscelatore vortex per 30-60 secondi
	5		1,2 ml per 1 test 2,4 ml per 2 test 3,6 ml per 3 test		Trasferire 1,2-3,6 ml di campione trattato con la soluzione MIS in una provetta secondaria con tappo a vite
	6		5 minuti		Sonificare il campione trattato con la soluzione MIS
	7		Max 1 minuto		Centrifugare il campione per non più di 1 minuto alla massima forza centrifuga relativa (RCF) di $3000 \times g$
	8				Caricare il campione senza tappo sul cobas® 5800 System o sui cobas® 6800/8800 Systems e avviare la seduta per il tipo di campione: espettato grezzo

**Tabella 13** Flusso di lavoro - Tipo di campione sedimenti

BSL-3 (BSC)	1		0,2 ml per 1 test 0,4 ml per 2 test 0,6 ml per 3 test	Trasferire 0,2-0,6 ml di campione di sedimenti in una provetta secondaria con tappo a vite
	2			Aggiungere 5 parti di soluzione MIS a 1 parte di campione di sedimenti <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 ml di soluzione MIS per 1 test (campione di sedimenti di 0,2 ml)</li> <li>• 2 ml di soluzione MIS per 2 test (campione di sedimenti di 0,4 ml)</li> <li>• 3 ml di soluzione MIS per 3 test (campione di sedimenti di 0,6 ml)</li> </ul>
	3		30-60 secondi	Agitare vigorosamente o usare un miscelatore vortex per 30-60 secondi
	4		≥ 60 minuti	Incubare il campione per almeno 60 minuti a 15-30°C (temperatura ambiente)
	5		30-60 secondi	Agitare vigorosamente o usare un miscelatore vortex per 30-60 secondi
	6		5 minuti	Sonificare il campione trattato con la soluzione MIS
	7		Max 1 minuto	Centrifugare il campione per non più di 1 minuto alla massima forza centrifuga relativa (RCF) di $3000 \times g$
	8			Caricare il campione senza tappo sul cobas® 5800 System o sui cobas® 6800/8800 Systems e avviare la seduta per il tipo di campione: sedimenti

## Trattamento dei campioni di espettato grezzo

- Verificare che il contenitore dell'espettato sia etichettato correttamente e che contenga almeno 0,4 ml di espettato. Se il campione è stato conservato congelato, scongelarlo e portarlo a temperatura ambiente.
- Capovolgere i flaconi di soluzione MIS due o quattro volte prima dell'uso.
- Aprire il contenitore del campione di espettato e aggiungere circa 2 parti di soluzione MIS a 1 parte di espettato (ad esempio, 2 ml di soluzione MIS per 1 ml di espettato) stimando il volume ad occhio e utilizzando una pipetta monouso. Richiudere bene il contenitore dell'espettato.
- Richiudere i flaconi della soluzione MIS subito dopo l'uso.
- Agitare vigorosamente o usare un miscelatore vortex per 30-60 secondi.
 

**Nota:** accertarsi che tutto il campione di espettato si sia miscelato con la soluzione MIS.
- Incubare il campione per almeno 60 minuti a 15-30°C (temperatura ambiente).
 

**Nota:** per conoscere le condizioni di conservazione massime, consultare il paragrafo “Conservazione dei campioni inattivati”.
- Agitare vigorosamente o usare un miscelatore vortex per 30-60 secondi, o finché il campione non risulterà perfettamente omogeneo.
- Trasferire un minimo di 1,2 ml e non più di 3,6 ml di campione di espettato trattato con la soluzione MIS in una provetta in polipropilene da 5 ml, 75 × 13 mm, con tappo a vite, fondo tondo ed etichetta termostabile (Sarstedt provetta P/N 60.504.010, tappo a vite P/N 65.163). Chiudere bene la provetta.
 

**Nota:** prima di trasferire il campione, verificare che le informazioni del barcode sul contenitore dell'espettato e sulla provetta secondaria da 5 ml corrispondano.

**Nota:** vedere la Tabella 14.
- Prima di eseguire il test cobas® MTB-RIF/INH, sonificare il campione inattivato come descritto nel paragrafo “Sonicazione dei campioni”.

## Trattamento dei sedimenti di espettato e di BAL

- Verificare che il contenitore dei sedimenti di espettato e di BAL trattati con NALC-NaOH sia etichettato correttamente e contenga almeno 0,2 ml di campione. Se il campione è stato conservato congelato, scongelarlo e portarlo a temperatura ambiente.
- Agitare con un miscelatore vortex il campione per almeno 10 secondi.
- Trasferire un minimo di 0,2 ml e non più di 0,6 ml di campione di sedimenti in una provetta in polipropilene da 5 ml, 75 × 13 mm, con tappo a vite, fondo tondo, etichettata (Sarstedt - provetta P/N 60.504.010, tappo a vite P/N 65.163).
 

**Nota:** prima di trasferire il campione, verificare che le informazioni del barcode sul contenitore del campione e sulla provetta secondaria da 5 ml corrispondano.
- Capovolgere i flaconi di soluzione MIS due o quattro volte prima dell'uso.
- Aggiungere 5 parti di soluzione MIS a 1 parte di campione (ad esempio, 1 ml di soluzione MIS per 0,2 ml di campione). Chiudere bene la provetta.
 

**Nota:** vedere la Tabella 14.
- Richiudere i flaconi della soluzione MIS subito dopo l'uso.
- Agitare vigorosamente o usare un miscelatore vortex per 30-60 secondi.
 

**Nota:** accertarsi che tutto il campione si sia miscelato con la soluzione MIS.

- Incubare il campione per almeno 60 minuti a 15-30°C (temperatura ambiente).
 

**Nota:** per conoscere le condizioni di conservazione massime, consultare il paragrafo “Conservazione dei campioni inattivati”.
- Agitare vigorosamente o usare un miscelatore vortex per 30-60 secondi.
- Prima di eseguire il test cobas® MTB-RIF/INH, sonificare il campione inattivato come descritto nel paragrafo “Sonicazione dei campioni”.

**Tabella 14** Volumi dei campioni trattati con cobas® Microbial Inactivation Solution per il test cobas® MTB-RIF/INH

N. di test da eseguire dalla provetta secondaria	Volume min richiesto di campione trattato con MIS	Volume max richiesto di campione trattato con MIS
Ordine con 1 test	1,2 ml	3,6 ml
Ordini con 2 test*	2,4 ml	3,6 ml
Ordini con 3 test*	3,6 ml	3,6 ml

\* Utilizzabile per le analisi in batch misti da eseguire con altri test cobas® 5800/6800/8800 per lo stesso tipo di campione o con i test di ripetizione.

## Sonicazione dei campioni

- Prima di eseguire il test cobas® MTB-RIF/INH, è necessario sottoporre i campioni a sonicazione con l'apposito dispositivo TS 5 di Rinco Ultrasonics AG (P/N 46690). L'uso di altri sonicatori potrebbe determinare falsi positivi, falsi negativi e/o risultati non validi. Il funzionamento del sonicatore è descritto dettagliatamente nella Guida Utente fornita dal produttore.
- Su un rack MPA posizionare cinque provette chiuse con il tappo a vite, dotate di etichette barcode e contenenti 1,2-3,6 ml di campione trattato con la soluzione MIS.

**Nota:** assicurarsi che le etichette barcode termostabili sulle provette campione siano orientate e ben visibili attraverso le fessure in alto, sul lato del rack per campioni MPA (vedere la Figura 1).

**Nota:** assicurarsi che ogni provetta contenga un'etichetta barcode termostabile.

**Nota:** assicurarsi che tutte le cinque posizioni delle provette sul rack MPA siano occupate. Se si hanno a disposizione meno di cinque provette con i campioni trattati con la soluzione MIS, è necessario che le posizioni vuote rimanenti siano occupate da provette con etichette barcode termostabili dello stesso tipo, riempite con acqua o con la soluzione MIS.

**Figura 1** Posizionamento corretto delle provette campione sul rack MPA prima della sonicazione



- Avviare il sonicatore per provette.
- Selezionare il profilo di sonicazione predefinito per i campioni respiratori.
- Aprire il dispositivo di sonicazione per provette e inserire il rack MPA seguendo le istruzioni del produttore.

- Chiudere il sonicatore per provette.
- Avviare la seduta di sonicazione.
- Confermare che la seduta di sonicazione è terminata correttamente e rimuovere il rack MPA.

**Nota:** è normale che le provette campione si riscaldino durante la seduta di sonicazione. Fare attenzione nel rimuovere il rack MPA con le provette campione.

**Nota:** se la sonicazione non riesce, consultare le istruzioni del produttore, correggere la causa e ripetere la seduta di sonicazione dopo aver atteso almeno 15 minuti che i campioni si siano raffreddati.

- A questo punto, i campioni trattati con la soluzione MIS e sottoposti a sonicazione possono essere analizzati con il test **cobas® MTB-RIF/INH** oppure conservati nel rispetto delle condizioni descritte in “Conservazione dei campioni inattivati”.

## **Esecuzione del test **cobas® MTB-RIF/INH** sul **cobas® 5800 System****

Il test **cobas® MTB-RIF/INH** può essere eseguito con un volume di campione minimo di 1,2 ml, di cui 850 µl vengono analizzati. La procedura del test è descritta dettagliatamente nella Guida Utente e/o nell'Assistenza Utente del **cobas® 5800 System**. La Figura 2 sottostante riassume la procedura.

- Prima di stappare le provette e caricare i campioni sul **cobas® 5800 System**, si raccomanda di pellettare detriti cellulari e di matrice centrifugando i campioni per massimo 1 minuto alla massima forza centrifuga relativa (RCF) di 3000 × g.
- Una seduta singola può includere una combinazione di campioni (espettorato grezzo, sedimenti).

**Nota:** se è trascorsa più di 1 ora dalla sonicazione, prima della centrifugazione agitare con un miscelatore vortex i campioni per almeno 10 secondi.

**Nota:** omettendo la centrifugazione, potrebbe aumentare la percentuale di coaguli nel campione rilevati dal **cobas® 5800 System**.

**Figura 2 Procedura del test cobas® MTB-RIF/INH sul cobas® 5800 System**

- 1** Eseguire la procedura di accesso al sistema
- 2** Caricamento dei campioni sul sistema
  - Stappare la provetta
  - Trasferire la provetta direttamente nel rack
  - Caricare i rack per campioni sul sistema
  - Il sistema si prepara automaticamente
  - Ordinare i test
    - Selezionare il tipo di campione “Raw sputum” per analizzare i campioni di espettorato grezzo trattati con la soluzione MIS
    - Selezionare il tipo di campione “Sediment” per analizzare i campioni di sedimenti di espettorato e di BAL trattati con la soluzione MIS
- 3** Caricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema
  - Caricare le cassette dei reagenti specifici per il test
  - Caricare i minirack per i controlli
  - Caricare i puntali di estrazione
  - Caricare i puntali di eluizione
  - Caricare le piastre di estrazione
  - Caricare le piastre per rifiuti liquidi
  - Caricare le piastre di amplificazione
  - Caricare la cassetta MGP
  - Ricaricare il diluente per campioni
  - Ricaricare il reagente di lisi
  - Ricaricare il reagente di lavaggio
- 4** Avviare la seduta selezionando il pulsante Start processing nell'interfaccia utente; tutte le sedute successive si avvieranno automaticamente, a meno che non vengano posticipate manualmente
- 5** Rivedere ed esportare i risultati
- 6** Rimuovere e tappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro
 

Pulire lo strumento

  - Scaricare i minirack per i controlli vuoti
  - Scaricare le cassette dei reagenti specifici per il test
  - Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione
  - Svuotare i rifiuti liquidi
  - Svuotare i rifiuti solidi

## Esecuzione del test cobas® MTB-RIF/INH sui cobas® 6800/8800 Systems

Il test cobas® MTB-RIF/INH può essere eseguito con un volume di campione minimo di 1,2 ml, del quale vengono analizzati 850 µl. Il funzionamento dello strumento è descritto dettagliatamente nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente dei cobas® 6800/8800 Systems. La Figura 3 sottostante riassume la procedura.

- Prima di stappare le provette e caricare i campioni sui cobas® 6800/8800 Systems, si raccomanda di pellettare detriti cellulari e di matrice centrifugando i campioni per massimo 1 minuto alla massima forza centrifuga relativa (RCF) di  $3000 \times g$ .
- Una seduta singola può includere una combinazione di campioni (espettato grezzo, sedimenti).

**Nota:** se è trascorsa più di 1 ora dalla sonicazione, prima della centrifugazione agitare con un miscelatore vortex i campioni per almeno 10 secondi.

**Nota:** omettendo la centrifugazione, potrebbe aumentare la percentuale di coaguli nel campione rilevati dai cobas® 6800/8800 Systems.

**Figura 3** Procedura del cobas® MTB-RIF/INH sui cobas® 6800/8800 Systems

- |   |   |
|---|---|
| 1 | <p>Eseguire la procedura di accesso al sistema<br/>Premere Avvio per preparare il sistema<br/>Ordinare i test</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Selezionare il tipo di campione “Raw sputum” per analizzare i campioni di espettorato grezzo trattati con la soluzione MIS</li> <li>• Selezionare il tipo di campione “Sediment” per analizzare i campioni di sedimenti di espettorato e di BAL trattati con la soluzione MIS</li> </ul>   |
| 2 | <p>Caricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Caricare la cassetta dei reagenti specifici per il test</li> <li>• Caricare le cassette dei controlli</li> <li>• Caricare i puntali di pipettamento</li> <li>• Caricare le piastre di estrazione</li> <li>• Caricare il reagente MGP</li> <li>• Caricare le piastre di amplificazione</li> <li>• Ricaricare il diluente per campioni</li> <li>• Ricaricare il reagente di lisi</li> <li>• Ricaricare il reagente di lavaggio</li> </ul> |
| 3 | <p>Caricamento dei campioni sul sistema</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Per ogni campione           <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Stappare la provetta</li> <li>◦ Trasferire la provetta nel rack</li> </ul> </li> <li>• Caricare il rack per campioni e i rack per puntali otturati sullo stesso modulo di inserimento dei campioni</li> <li>• Confermare che i campioni sono stati accettati dal modulo di trasferimento</li> </ul>   |
| 4 | Avviare la seduta   |
| 5 | Rivedere ed esportare i risultati   |
| 6 | <p>Rimuovere e tappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro</p> <p>Pulire lo strumento</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Scaricare le cassette dei controlli vuote</li> <li>• Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione</li> <li>• Svuotare i rifiuti liquidi</li> <li>• Svuotare i rifiuti solidi</li> </ul>  |

## Risultati

Il test **cobas®** MTB-RIF/INH rileva automaticamente le mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina e le mutazioni associate alla resistenza all'isoniazide, sia nei campioni che nei controlli, visualizzando la validità del test e i risultati dei singoli target.

### Controllo di qualità e validità dei risultati sul **cobas® 5800 System**

- Un controllo negativo [(-) Ctrl] e un controllo positivo [MTB-RIF/INH (+) C] vengono analizzati almeno ogni 72 ore o con ogni nuovo lotto del kit. È possibile aumentare la frequenza con cui sono programmati i controlli positivi e/o negativi in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali.
- Per verificare la validità dei risultati, controllare se nel **cobas® 5800** software e/o nel report sono presenti flag con risultati associati.

Il **cobas® 5800** software considera automaticamente non validi i risultati in caso di fallimento del controllo negativo o dei controlli positivi.

**NOTA:** il **cobas® 5800 System** è preimpostato in modo che venga eseguita una serie di controlli (positivi e negativi) con ogni seduta; tuttavia è possibile configurare una frequenza inferiore, fino a 72 ore, in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali. Per maggiori informazioni, rivolgersi ad un tecnico Roche e/o all'assistenza clienti Roche.

### Risultati dei controlli sul **cobas® 5800 System**

I risultati dei controlli sono visualizzati nell'app “Controls” del software **cobas® 5800**.

- I controlli sono contrassegnati come “validi” nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono validi. I controlli sono contrassegnati come “non validi” nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono non validi.
- Ai controlli “non validi” viene associato un avviso nella colonna degli avvisi. Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui il controllo è contrassegnato come non valido e vengono mostrati gli eventuali avvisi.
- Se uno dei controlli non è valido, è necessario analizzare di nuovo tutti i controlli e tutti i campioni associati.

### Controllo di qualità e validità dei risultati sui **cobas® 6800/8800 Systems**

- Con ogni batch di un tipo di risultato richiesto vengono analizzati anche un controllo negativo [(-) Ctrl] e un controllo positivo [MTB-RIF/INH (+) C].
- Verificare se, nel software **cobas® 6800/8800** e/o nel report, sono presenti avvisi e risultati ad essi associati, per accertarsi della validità del batch.
- Per una descrizione di tutti i flag, consultare l'Assistenza Utente e/o la Guida Utente dei **cobas® 6800/8800 Systems**.
- Il batch è valido se non sono presenti flag per nessuno dei controlli. Se il batch non è valido, ripetere il test sull'intero batch.

La validazione dei risultati viene eseguita automaticamente dal software dei **cobas® 6800/8800 Systems** sulla base delle prestazioni dei controlli negativi e positivi.

## Interpretazione dei risultati

**Tabella 15** Risultati e interpretazione del test cobas® MTB-RIF/INH

Target 1	Target 2	Target 3	Target 4	Interpretazione
<b>INH Negative</b>	<b>RIF1 Negative</b>	<b>RIF2 Negative</b>	<b>RIF3 Negative</b>	Il risultato per INH è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Negative</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Negative</b>	<b>RIF 3 Negative</b>	Il risultato per INH è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Negative</b>	<b>RIF 1 Negative</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Negative</b>	Il risultato per INH è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Negative</b>	<b>RIF 1 Negative</b>	<b>RIF 2 Negative</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Negative</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Negative</b>	Il risultato per INH è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Negative</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Negative</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Negative</b>	<b>RIF 1 Negative</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Negative</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Negative</b>	<b>RIF 2 Negative</b>	<b>RIF 3 Negative</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Non sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Negative</b>	<b>RIF 3 Negative</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.

Target 1	Target 2	Target 3	Target 4	Interpretazione
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Negative</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Negative</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>Invalid</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>Invalid</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Negative</b>	<b>RIF 2 Negative</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Negative</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>Invalid</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Negative</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>Invalid</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Negative</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>Invalid</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra.
<b>Invalid</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	Il risultato per INH non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.

Target 1	Target 2	Target 3	Target 4	Interpretazione
<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>Invalid</b>	Il risultato per INH non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>Invalid</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>Invalid</b>	Il risultato per INH non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>Invalid</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>Invalid</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>Invalid</b>	<b>RIF 1 Positive</b>	<b>RIF 2 Positive</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>INH Positive</b>	<b>RIF 1 Negative</b>	<b>Invalid</b>	<b>RIF 3 Positive</b>	Il risultato per INH è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza INH. Il risultato per RIF è valido. Sono state rilevate mutazioni associate alla resistenza RIF.
<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	<b>Invalid</b>	Il risultato per INH non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra. Il risultato per RIF non è valido. Per le istruzioni, vedere sopra.

## Interpretazione dei risultati sul cobas® 5800 System

I risultati dei campioni sono visualizzati nell'app “Risultati” del software cobas® 5800.

Nel caso di un batch di controllo valido, verificare nel software cobas® 5800 e/o nel report se sono presenti eventuali avvisi per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- I campioni associati a un batch di controllo valido sono mostrati come “Validi” nella colonna “Risultato di controllo” se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come validi nel report. I campioni associati a un batch di controllo non valido sono mostrati come “Non validi” nella colonna “Risultato di controllo” se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come non validi nel report.
- Se i controlli associati di un risultato campione sono non validi, verrà aggiunto un flag specifico al risultato campione nel modo seguente:
  - Q05D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo positivo non valido
  - Q06D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo negativo non valido
- I valori nella colonna “Risultati” relativi ai singoli risultati dei target dei campioni devono essere interpretati nel modo indicato nella Tabella 15.

Se uno o più target dei campioni sono contrassegnati con “Non valido”, il software cobas® 5800 mostra un flag nella colonna “Flag”. Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui i target dei campioni sono contrassegnati come non validi e vengono mostrati gli eventuali avvisi.

**Figura 4** Esempio di risultati del test **cobas®** MTB-RIF/INH sul **cobas®** 5800 System

ID campione	Test	Risultato di controllo	Flag	Stato	Risultato				Data/ora creazione
MRI_RS_inv-01	MTB-RIF/INH	Valid	🚩	Released	INH Invalid	RIF1 Invalid	RIF2 Invalid	RIF3 Invalid	7/1/2022 11:45:19 AM
MRI_RS_neg-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Negative	7/1/2022 11:45:20 AM
MRI_RS_neg-02	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Negative	7/1/2022 11:45:20 AM
MRI_RS_pos-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Positive (Ct 41.56)	RIF1 Positive (Ct 40.12)	RIF2 Positive (Ct 41.08)	RIF3 Positive (Ct 40.38)	7/1/2022 11:45:18 AM
MRI_RS_pos-02	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Positive (Ct 40.22)	RIF1 Positive (Ct 42.00)	RIF2 Positive (Ct 42.78)	RIF3 Positive (Ct 42.77)	7/1/2022 11:45:19 AM
MRI_S_inv-01	MTB-RIF/INH	Valid	🚩	Released	INH Invalid	RIF1 Invalid	RIF2 Invalid	RIF3 Invalid	7/1/2022 11:45:18 AM
MRI_S_neg-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	INH Negative	7/1/2022 11:45:18 AM

## Interpretazione dei risultati sui **cobas® 6800/8800 Systems**

Se un batch è valido, verificare nel software dei **cobas® 6800/8800 Systems** e/o nel report se sono presenti flag per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- Un batch valido può includere risultati dei campioni validi e non validi.
- Le colonne “Valido” e “Risultato totale” non sono attinenti ai risultati dei campioni del test **cobas® MTB-RIF/INH** e sono contrassegnate con “NA”. I valori indicati in queste colonne non sono attinenti e **non** influenzano la validità dei risultati indicati nelle singole colonne “Risultato target”.
- I risultati dei target riportati per i singoli campioni sono validi, a meno che la colonna “Risultato target” non riporti “Non valido”. Tenere presente che i risultati dichiarati per le mutazioni associate alla resistenza RIF potrebbero contenere uno o due risultati non validi per i singoli target, come illustrato nella Tabella 15.
- È possibile che nei canali di rilevazione RIF (Target 2, Target 3, Target 4) venga rilevata più di una mutazione associata alla resistenza RIF. Il test **cobas® MTB-RIF/INH** non discrimina le mutazioni specifiche associate alla resistenza RIF.
- È possibile che nel canale di rilevazione INH (Target 1) venga rilevata più di una mutazione associata alla resistenza INH. Il test **cobas® MTB-RIF/INH** non discrimina le mutazioni specifiche associate alla resistenza INH.
- Il test **cobas® MTB-RIF/INH** è un esame reflex per il test **cobas® MTB**. In quanto tale, si basa sulla rilevazione del DNA wild-type del complesso MTB per monitorare l'intero processo di preparazione dei campioni e amplificazione PCR. Il test **cobas® MTB** si distingue dal test **cobas® MTB-RIF/INH** perché più sensibile nel rilevare il DNA del complesso MTB grazie all'approccio del doppio target, con un target presente in più copie genomiche. Di conseguenza, nei casi in cui non vengono rilevati né il complesso MTB, né le mutazioni associate alla resistenza ai farmaci, il test **cobas® MTB-RIF/INH** non consente di stabilire se siano presenti o meno delle mutazioni associate alla resistenza ai farmaci (il risultato sarà “Invalid” nella colonna Target Result corrispondente: Tabella 15). In questi casi:
  - Verificare la presenza di flag associati. I flag “C02H1-H5” indicano che il DNA del complesso MTB è insufficiente, in assenza di altri flag.

- Ripetere il test sul campione inattivato se è disponibile un volume sufficiente (Tabella 14) e se il campione inattivato è stato conservato alle condizioni descritte in “Conservazione dei campioni inattivati”. In alternativa, ripetere il test prelevando un nuovo campione.
- Prendere in considerazione il possibile arricchimento della carica batterica di *M. tuberculosis* tramite espansione in coltura, oppure con metodi alternativi se lo stesso paziente genera risultati non validi ripetutamente.
- I risultati del test devono essere interpretati contestualmente alle altre informazioni raccolte attraverso la valutazione clinica del paziente e la relativa anamnesi.

Nella Tabella 15 sono riportati i risultati con l'interpretazione corrispondente ai fini della rilevazione delle mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina (RIF) e all'isoniazide (INH).

**Figura 5** Esempio di risultati del test **cobas®** MTB-RIF/INH sui **cobas®** 6800/8800 Systems

Test	ID campione	Valido	Flag	Tipo di campione	Risultato totale	Target 1	Target 2	Target 3	Target 4
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_Suspect_R_0001	NA		Raw Sputum	NA	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Positive	RIF3 Negative
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_Suspect_R_0002	NA		Raw Sputum	NA	INH Positive	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Positive
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_Suspect_R_0003	NA	P02T	Raw Sputum	NA	Invalid	Invalid	Invalid	Invalid
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_Suspect_S_0001	NA		Sediment	NA	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Positive	RIF3 Negative
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_Suspect_S_0002	NA		Sediment	NA	INH Positive	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Positive
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_Suspect_S_0003	NA	C02H1	Sediment	NA	Invalid	Invalid	Invalid	Invalid
MTB-RIF/INH 850 µL	C161420284090428828404	Yes		(-) Ctrl	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid
MTB-RIF/INH 850 µL	C161420284093009580264	Yes		MTB-RIF/INH (+) C	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid

## Limiti della procedura

- Il test **cobas®** MTB-RIF/INH deve essere sempre accompagnato da un esame colturale dei micobatteri e da un test di suscettibilità ai farmaci e, in quanto test reflex, deve essere eseguito in associazione con il test **cobas®** MTB (campioni con risultati positivi in base al test **cobas®** MTB) per ridurre al minimo il rischio di falsi positivi, falsi negativi e/o risultati non validi. Le prestazioni del test **cobas®** MTB-RIF/INH sono state validate per i campioni di espettatorato grezzo e di sedimenti di espettatorato e di BAL precedentemente liquefatti, decontaminati e concentrati utilizzando NALC-NaOH. L'uso di altri tipi di campioni potrebbe causare falsi positivi, falsi negativi e/o risultati non validi. La digestione e la decontaminazione devono svolgersi secondo le procedure raccomandate dal CDC per il trattamento con NALC-NaOH.<sup>15</sup> L'uso di procedure alternative per la preparazione dei campioni nella fase pre-analitica potrebbe causare falsi positivi, falsi negativi e/o risultati non validi.
- L'uso del test **cobas®** MTB-RIF/INH è stato validato per i campioni di espettatorato grezzo e di sedimenti di espettatorato e di BAL trattati con NALC-NaOH e inattivati chimicamente con la soluzione MIS. L'uso di altre procedure di inattivazione non è stato oggetto di valutazione e potrebbe determinare falsi positivi, falsi negativi e/o risultati non validi.

- Il successo della procedura di inattivazione del bacillo TB dipende dal rispetto delle procedure descritte in questo documento e dalla miscelazione completa del campione con la soluzione MIS. Il trattamento preanalitico dei campioni dei pazienti con la soluzione MIS riduce, ma potrebbe non eliminare del tutto, il rischio di infezione TB.
- Il superamento dei limiti di volume e/o le deviazioni dalla procedura descritta in “Trattamento dei campioni di espettato grezzo”, “Trattamento dei sedimenti di espettato e di BAL” e “Sonicazione dei campioni” potrebbero causare risultati falsi positivi, falsi negativi e/o non validi.
- I test di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT) non sono in grado di determinare la vitalità di un organismo.
- Questo test non consente di verificare l'efficacia o l'inefficacia della terapia antitubercolare.
- L'uso di questo prodotto deve essere limitato al personale addestrato all'uso delle tecniche PCR e dei cobas® 5800/6800/8800 Systems.
- Il test cobas® MTB-RIF/INH è stato oggetto di valutazione soltanto in associazione con cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit, cobas® Buffer Negative Control Kit, cobas omni MGP Reagent, cobas omni Lysis Reagent, cobas omni Specimen Diluent e cobas omni Wash Reagent per l'uso sui cobas® 5800/6800/8800 Systems, con la soluzione MIS e con il sonicatore TS 5 di Rinco Ultrasonics AG.
- L'affidabilità dei risultati è influenzata dal metodo di raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.
- Il test cobas® MTB-RIF/INH non è stato oggetto di valutazione con pazienti di età inferiore ai 18 anni.
- Il test cobas® MTB-RIF/INH non è destinato all'uso con campioni respiratori come esame di fine cura.
- Il test cobas® MTB-RIF/INH non discrimina tra le varie specie del complesso MTB.
- La rilevazione delle mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina e delle mutazioni associate alla resistenza all'isoniazide dipende dal numero di organismi del complesso MTB presenti nel campione e risente anche del metodo di prelievo del campione e da fattori legati al paziente (ad esempio, età, gravità della patologia, condizione HIV).
- Nel caso di pazienti con infezione sia da MTB che da HIV, aumentano le probabilità che l'analisi microscopica dello striscio sia negativa e che il complesso MTB sia presente al di sotto del limite di sensibilità del test.
- Gli operatori sanitari dovranno interpretare i risultati tenendo conto della storia del paziente, del quadro clinico generale e degli esiti di altri esami radiografici e di laboratorio.
- L'inibizione della polimerasi potrebbe causare risultati falsi negativi o non validi. La rilevazione del DNA del complesso MTB inerente al campione è inclusa nella formulazione del test cobas® MTB-RIF/INH sotto forma di controllo interno, così da assicurare che i campioni contengano il DNA del complesso MTB in quantità sufficiente.
- Sebbene l'aggiunta dell'enzima AmpErase al reagente Master Mix cobas® MTB-RIF/INH garantisca l'amplificazione selettiva del DNA target, è necessario evitare la contaminazione dei reagenti attenendosi scrupolosamente alle buone pratiche di laboratorio e alle procedure descritte in questo documento di Istruzioni per l'uso.
- Sebbene siano rare, le mutazioni associate alla resistenza ai farmaci potrebbero non essere rilevate se sono presenti più mutazioni molto ravvicinate tra loro.
- A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, si consiglia agli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, di svolgere uno studio sulla correlazione tra i metodi nel proprio laboratorio, così da qualificare tali differenze. Non è dunque prevedibile una concordanza percentuale del 100% tra i risultati, proprio a causa delle differenze descritte tra le tecnologie.

- L'utente dovrà validare l'uso di provette diverse da quelle raccomandate nella Tabella 10, prima di integrare tali provette nel flusso di lavoro **cobas®** MTB-RIF/INH del laboratorio. L'uso di altri tipi di provette potrebbe causare danni alle provette stesse e contaminare la superficie del sonicatore. Potrebbero inoltre essere generati risultati falsi negativi a causa del trasferimento di energia di sonicazione insufficiente.
- L'utente dovrà validare l'uso di barcode diversi da quelli raccomandati nella Tabella 10, prima di integrare tali barcode nel flusso di lavoro **cobas®** MTB-RIF/INH del laboratorio. L'uso di altri tipi di barcode potrebbe causare danni al barcode.

## Valutazione delle prestazioni

### Caratteristiche delle prestazioni chiave sui cobas® 6800/8800 Systems

#### Inattivazione del campione

La riduzione del rischio di infezione da MTB attraverso il trattamento dei campioni con la soluzione MIS è stata oggetto di valutazione tramite colture ad alta positività di due ceppi del complesso MTB (MTB CDC268 e MTB H37) presso tre diversi siti e con tre diversi lotti del reagente MIS. Per ogni condizione, cinque aliquote di colture con livelli di concentrazione fino a  $5 \times 10^7$  CFU/ml sono state trattate con la soluzione MIS in un rapporto 1:2 per 60 minuti a temperatura ambiente. Successivamente i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a  $3000 \times g$ , lavati due volte con tampone PBS sterile e infine risospesi in 0,5 ml di tampone PBS sterile. In due siti è stato inoculato l'intero campione inattivato ed è stata osservata la crescita con il sistema di identificazione batterica BACTEC™ MGIT™ 320 (Becton Dickinson). Nel terzo sito è stato eseguito un test della vitalità del complesso MTB su terreno di coltura solido Löwenstein-Jensen (LJ). In nessuno dei campioni inattivati è stata osservata la crescita dei batteri del complesso *M. tuberculosis* al termine del periodo di incubazione di 56 giorni.

#### Limite di sensibilità (LoD)

Il limite di sensibilità del test cobas® MTB-RIF/INH è stato calcolato analizzando le diluizioni seriali di un ceppo mutante del complesso MTB, portatore della mutazione prevalente S531L associata alla resistenza alla rifampicina (gene *rpoB*) e della mutazione prevalente S315T associata alla resistenza all'isoniazide (gene *katG*), in due matrici cliniche negative che erano state unite in pool (espettato grezzo e sedimenti di espettato/BAL). I pannelli, costituiti da 10-11 livelli di concentrazione più un bianco, sono stati analizzati complessivamente 72 volte per ogni livello di concentrazione e ogni tipo di campione, utilizzando tre lotti di reagenti del test cobas® MTB-RIF/INH in più sedute, su più giorni, da più operatori e su più strumenti.

Il limite LoD per la rilevazione degli organismi *M. tuberculosis* RIF-resistenti è risultato essere compreso tra 94,0 CFU/ml (sedimenti di espettato/BAL) e 182 CFU/ml (espettato grezzo).

Il limite LoD per la rilevazione degli organismi *M. tuberculosis* INH-resistenti è risultato essere compreso tra 12,6 CFU/ml (sedimenti di espettato/BAL) e 27,5 CFU/ml (espettato grezzo).

#### Etero resistenza

La capacità di rilevare il DNA mutante di MTB in un'infezione mista con MTB wild-type è stata confermata eseguendo dei test con DNA mutante-wild-type presenti in varie proporzioni. I livelli di concentrazione bassi (circa  $3 \times$  LoD) dell'isolato da coltura MDR-MTB, su un fondo costituito fino al 60% da MTB wild-type, vengono rilevati dal test cobas® MTB-RIF/INH nei campioni di espettato grezzo, di espettato e di sedimenti BAL.

#### Inclusività per le mutazioni associate alla resistenza

Per quanto riguarda le mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina nel gene *rpoB* e le mutazioni associate alla resistenza all'isoniazide nel gene *katG* e nella regione promoter del gene *inhA* negli organismi del complesso MTB, l'inclusività è stata verificata analizzando degli stock di colture di ceppi del complesso MTB resistenti alla rifampicina e/o all'isoniazide portatori delle 23 mutazioni seguenti:

- Mutazioni del gene *rpoB* associate alla resistenza fenotipica alla rifampicina:
  - L511P
  - Q513K, Q513L, Q513P
  - D516V, D516Y
  - S522L, S522Q
  - H526D, H526L, H526N, H526R, H526Y
  - S531L, S531W
  - L533P
- Mutazioni del gene *katG* e mutazioni della regione promoter del gene *inhA* associate alla resistenza fenotipica all'isoniazide:
  - Gene *katG*:
    - S315I, S315N, S315T, S315T2
  - Regione promoter del gene *inhA*:
    - T-8A, T-8C
    - C-15T

Tutte le mutazioni sono state rilevate a una concentrazione di 545 CFU/ml nei campioni di espettorato grezzo e a una concentrazione di 282 CFU/ml nei campioni di sedimenti BAL.

Per quanto riguarda altre due mutazioni del gene *rpoB* associate alla resistenza alla rifampicina (S522W e D516G), l'inclusività è stata verificata analizzando i plasmidi. Entrambe le mutazioni sono state rilevate alla concentrazione di 77 copie/ml.

## Specificità per il complesso MTB wild-type

Per quanto riguarda il complesso MTB wild-type, la specificità analitica è stata verificata analizzando 13 ceppi di MTB a livelli di concentrazione elevati (circa 1,00E+04 CFU/ml) nei campioni di espettorato grezzo e di sedimenti BAL e, per quanto riguarda i ceppi del complesso MTB elencati di seguito, a livelli di concentrazione bassi (circa 3 × LoD) nei campioni di sedimenti:

- *M. tuberculosis* (H37 ATCC® 25177™)
- *M. bovis* BCG (ceppo secondario Tokyo 172 NIBSC 07/272 WHO e ceppo secondario Moscow NIBSC 07/274 WHO)
- *M. africanum* (ATCC® 25420™)
- *M. bovis* sottospecie *bovis* (ATCC® 19210™)
- *M. canetti* (NLA 000016778)
- *M. caprae* (ATCC® BAA-824™)
- *M. microti* (ATCC® 19422™)
- *M. orygis* (NLA 001300863)
- *M. pinnipedii* (ATCC® BAA-688™)

Tutti i ceppi wild-type hanno prodotto risultati validi per RIF e INH.

## Precisione

La precisione interna del test è stata analizzata utilizzando un pannello costituito da un ceppo coltivato del complesso MTB mutante, portatore della mutazione prevalente S531L associata alla resistenza alla rifampicina (gene *rpoB*) e della mutazione prevalente S315T associata alla resistenza all'isoniazide (gene *katG*), in due matrici cliniche negative che erano state unite in pool (espettato grezzo e sedimenti di espettato/BAL). Le fonti di variabilità sono state esaminate utilizzando dei pannelli costituiti da tre livelli di concentrazione (compreso il bianco), utilizzando tre lotti di reagenti cobas® MTB-RIF/INH e due strumenti nel corso di 12 giorni, per complessive 24 sedute. Nella Tabella 16 è riportata una descrizione dei pannelli di precisione e dei tassi di positività osservati. Tutti i componenti del pannello negativo hanno generato risultati negativi in questo studio. Analizzando la deviazione standard e il coefficiente di variazione percentuale dei valori soglia (C<sub>t</sub>) ottenuti dai test validi eseguiti sui componenti del pannello positivo (vedere la Tabella 17), è stato possibile calcolare un CV (%) generale compreso tra 1,8% e 2,7% per quanto riguarda la rilevazione delle mutazioni associate alla resistenza INH e tra 1,5% e 2,1% per quanto riguarda la rilevazione delle mutazioni associate alla resistenza RIF.

**Tabella 16** Riepilogo della precisione intra-laboratorio

Concentrazione target	N. test	N. positivi	Tasso di positività	Intervallo di confidenza al 95%	
				Limite inferiore	Limite superiore
<i>M. tuberculosis</i> (espettato grezzo, target RIF)					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
182 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
545 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
<i>M. tuberculosis</i> (sedimento, target RIF)					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
94,0 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
282 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
<i>M. tuberculosis</i> (espettato grezzo, target INH)					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
27,5 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
82,5 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
<i>M. tuberculosis</i> (sedimento, target INH)					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
12,6 CFU/ml	48	47	97,9%	88,9%	99,9%
37,8 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%

**Tabella 17** Media complessiva, deviazioni standard e coefficienti di variazione (%) per il ciclo soglia - pannelli positivi per MTBC

Concentrazione target	Tasso di positività	Ct medio	Nella stessa seduta		Tra sedute		Tra giorni		Tra strumenti		Tra lotti		Totale	
			DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%
<i>M. tuberculosis</i> (espettoreto grezzo, target RIF)														
182 CFU/ml	100%	37,3	0,48	1,3	0,00	0,0	0,00	0,0	0,34	0,9	0,00	0,0	0,59	1,6
545 CFU/ml	100%	35,6	0,40	1,1	0,00	0,0	0,29	0,8	0,00	0,0	0,24	0,7	0,55	1,5
<i>M. tuberculosis</i> (sedimento, target RIF)														
94,0 CFU/ml	100%	39,3	0,36	0,9	0,14	0,3	0,45	1,1	0,00	0,0	0,42	1,1	0,72	1,8
282 CFU/ml	100%	38,0	0,40	1,0	0,12	0,3	0,54	1,4	0,41	1,1	0,00	0,0	0,80	2,1
<i>M. tuberculosis</i> (espettoreto grezzo, target INH)														
27,5 CFU/ml	100%	37,5	0,74	2,0	0,00	0,0	0,31	0,8	0,17	0,5	0,00	0,0	0,82	2,2
82,5 CFU/ml	100%	35,9	0,52	1,5	0,00	0,0	0,43	1,2	0,31	0,9	0,00	0,0	0,74	2,1
<i>M. tuberculosis</i> (sedimento, target INH)														
12,6 CFU/ml	97,9%	39,4	0,75	1,9	0,66	1,7	0,00	0,0	0,34	0,9	0,00	0,0	1,06	2,7
37,8 CFU/ml	100%	37,5	0,56	1,5	0,00	0,0	0,00	0,0	0,31	0,8	0,15	0,4	0,66	1,8

## Specificità analitica/reattività crociata

Per valutare la specificità analitica del test cobas® MTB-RIF/INH e la sua capacità di rilevare concentrazioni basse di MTB mutante e wild-type in presenza di altri organismi, è stato analizzato un pannello di 145 elementi costituito dai batteri, i funghi e i virus che sono presenti più frequentemente nel tratto respiratorio. Gli organismi elencati nella Tabella 18 sono stati aggiunti a concentrazioni di circa  $1 \times 10^6$  unità/ml per quanto riguarda i batteri e di circa  $1 \times 10^5$  unità/ml per quanto riguarda i virus. I test sono stati eseguiti con ogni potenziale organismo interferente, sia in assenza che in presenza del target complesso MTB mutante (aggiunto a 282 CFU/ml) e del target complesso MTB wild-type (aggiunto a 200 CFU/ml). Nessuno degli organismi ha interferito con le prestazioni del test generando risultati falsi positivi. La rilevazione del target complesso MTB mutante a concentrazioni basse non è stata influenzata dagli organismi analizzati, tranne per *M. asiaticum*, *M. fuerth*, *M. intermedium*, *M. marseillense*, *M. peregrinum* e *M. szulgai* a livelli di concentrazione  $> 1 \times 10^5$  CFU/ml e *M. chubuense* a livelli di concentrazione  $> 1 \times 10^4$  CFU/ml. La rilevazione del target complesso MTB wild-type a concentrazioni basse non è stata influenzata dagli organismi analizzati, tranne per *M. avium* sottospecie *hominissuis*, *M. avium* sottospecie *silvaticum*, *M. colombiense*, *M. gastri*, *M. lentiflavum* e *M. marinum* a livelli di concentrazione  $> 1 \times 10^5$  CFU/ml e per *M. avium* sottospecie *paratuberculosis*, *M. bouchedurhonense* e *M. vulneris* a livelli di concentrazione  $> 1 \times 10^4$  CFU/ml. La potenziale reattività crociata dei bacilli *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium mantenii* e *Mycobacterium timonense* è stata valutata *in silico*. I risultati delle valutazioni *in silico* lasciano presagire una bassa probabilità che quegli organismi vengano amplificati e rilevati dal test cobas® MTB-RIF/INH.

**Tabella 18** Microrganismi analizzati ai fini della specificità analitica/reattività crociata

Microrganismo	Concentrazione	Microrganismo	Concentrazione
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium gordoneae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Actinomyces isrealii</i>	8,5E+05 CFU/mL	<i>Mycobacterium holsaticum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Adenovirus</i>	1,0E+05 cp/ml	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intermedium</i>	1,0E+05 CFU/ml*

<b>Microrganismo</b>	<b>Concentrazione</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Concentrazione</b>
<i>Bacillus cereus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> sottospecie <i>subtilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacteroides fragilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kumamontonense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium malmoense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida albicans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marinum</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Candida glabrata</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marseillense</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Candida krusei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida tropicalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium nonchromogaeicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	1,0E+06 IFU/ml	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Citrobacter freundii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium simiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium szulgai</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium terrae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Eikenella corrodens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium triviale</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vaccae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i> sottospecie <i>cloacae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vulneris</i>	1,0E+04 CFU/ml*
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium xenopi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium yongonense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,0E+06 ccu/ml
<i>Escherichia coli</i> produttore di CTX-M-15 ESBL	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sottospecie <i>nucleatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria lactamica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria mucosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria sica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus dell'immunodeficienza umana	1,0E+05 cp/ml	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1,0E+06 geq/ml
Virus dell'influenza umana A	1,0E+05 U/ml	<i>Nocardia farcinica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus dell'influenza umana B	1,0E+05 U/ml	<i>Nocardia otitidiscauriarum</i>	1,0E+06 CFU/ml
Metapneumovirus umano	1,0E+05 U/ml	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,0E+06 geq/ml
Virus parainfluenzale umano tipo 1	1,0E+05 U/ml	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus parainfluenzale umano tipo 2	1,0E+05 U/ml	<i>Penicillium</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
Virus parainfluenzale umano tipo 3	1,0E+05 U/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus parainfluenzale umano tipo 4	1,0E+05 U/ml	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus respiratorio sinciziale umano tipo A	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus respiratorio sinciziale umano tipo B	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1,0E+06 CFU/ml
Rinovirus umano	1,0E+05 U/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Kingella kingae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Rhizopus</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Rhodococcus equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> produttore di carbapenemasi KPC-3	1,0E+06 CFU/ml	<i>Virus della rosolia (Rubella)</i>	1,0E+05 U/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> sottospecie <i>pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Virus del morbillo (Rubeola)</i>	1,0E+05 U/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Rubulavirus</i>	1,0E+05 U/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Scedosporium</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella micdadei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Serratia marcescens</i> sottospecie <i>marcescens</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella pneumophila</i> sottospecie <i>pneumophila</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> sottospecie <i>aureus</i>	1,0E+06 CFU/ml

<b>Microrganismo</b>	<b>Concentrazione</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Concentrazione</b>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sottospecie <i>mesenteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium arosiense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptococcus constellatus</i> sottospecie <i>constellatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> sottospecie <i>avium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus equi</i> sottospecie <i>equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> sottospecie <i>hominissuis</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptococcus mitis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> sottospecie <i>silvaticum</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptococcus mutans</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> sottospecie <i>paratuberculosis</i>	1,0E+04 CFU/ml*	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium bouchedurhonense</i>	1,0E+04 CFU/ml*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium celatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus salivarius</i> sottospecie <i>salivarius</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chimaera</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chubuense</i>	1,0E+04 CFU/ml*	<i>Streptococcus uberis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium colombiense</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptomyces anulatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium confluens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Tsukamurella</i> spp.	1,0E+06 geq/ml
<i>Mycobacterium flavescens</i>	1,0E+06 CFU/ml	Virus <i>Varicella Zoster</i>	1,0E+05 cp/ml
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Veillonella atypica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium fuerth</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Veillonella parvula</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium gastri</i>	1,0E+05 CFU/ml*	-	-

\* Livello al quale non è stata osservata nessuna interferenza con la rilevazione di *M. tuberculosis*; interferenza osservata invece eseguendo il test a 1,0E+06 CFU/ml.

## Interferenze

Sono stati valutati gli effetti delle sostanze esogene potenzialmente secrete nei campioni respiratori (Tabella 19). Ogni potenziale sostanza interferente è stata analizzata a livelli pari o superiori a quelli di rilevanza clinica, in campioni di espettatorato artefatto, sia in assenza che in presenza del target complesso MTB mutante (aggiunto a 545 CFU/ml) e del target complesso MTB wild-type (aggiunto a 200 CFU/ml).

Nessuna delle sostanze ha interferito con le prestazioni del test generando falsi risultati negativi o falsi risultati positivi. Nessuna delle sostanze ha interferito con la prestazioni del test generando risultati non validi/non dichiarati, ad eccezione del farfaraccio a livelli di concentrazione > 25 mg/ml.

**Tabella 19** Elenco delle sostanze esogene sottoposte al test di interferenza

<b>Sostanza</b>	<b>Concentrazione</b>	<b>Sostanza</b>	<b>Concentrazione</b>
Solfato di salbutamolo	0,5 µg/ml	Kanamicina monosolfato	240 µg/ml
Amikacina	80,1 µg/ml	Levofloxacina	5 mg/ml
Amoxicillina	86,4 µg/ml	Lidocaina HCl	1,2% (p/v)
Beclometasone	3459 pg/ml	Mentolo	0,50% (p/v)
Benzocaina	1,2% (p/v)	Salicilato di metile	0,06% (v/v)
Budesonide	3 mg/ml	Mometasone	100 µg/ml
Estratto di farfaraccio	25 mg/ml*	Moxifloxacina	15 µg/ml
Capreomicina	80 µg/ml	Mupirocina	0,05% (p/v)

Sostanza	Concentrazione	Sostanza	Concentrazione
Cloruro di cetylpiridinio	0,5% (p/v)	NaCl	5% (p/v)
Clorexidina gluconato	1% (v/v)	Nicotina	1 µg/ml
Cicloserina	105 µg/ml	Nistatina	1% (v/v)
Claritromicina	20 µg/ml	Oximetazolina	12 ng/ml
Dexametasone	601 ng/ml	Pentamidina	1366 ng/ml
Efedrina cloridrato	1 mg/ml	Fenilefrina	5 mg/ml
Epinefrina	100 pg/ml	Prednisolone	3 µg/ml
Etambutolo	50 µg/ml	Pirazinamide	240 µg/ml
Etionamide	15 µg/ml	Rifampicina	25 µg/ml
Eucaliptolo	0,002% (v/v)	Estratto di ortica (500 mg)	5 mg/ml
Flunisolide	400 µg/ml	Streptomicina	240 µg/ml
Fluticasone propionato	5 µg/ml	Zolfo	0,01% (p/v)
Formoterolo fumarato diidrato	66 µg/ml	Olio di melaleuca	0,50% (v/v)
Radice di idraste (capsule da 570 mg)	5,7 mg/ml	Teofillina	20 µg/ml
Guaifenesina	2,5 mg/ml	Tobramicina	24,1 µg/ml
Isoniazide	50 µg/ml	Zanamivir	0,1 mg/ml

\* Livello più alto al quale non è stata osservata nessuna interferenza

È stata inoltre valutata l'interferenza delle sostanze endogene che potrebbero trovarsi nei campioni respiratori (Tabella 20). Ogni potenziale sostanza interferente è stata analizzata a livelli pari o superiori a quelli di rilevanza clinica, in campioni di espettatorato artefatto, sia in assenza che in presenza del target complesso MTB mutante (aggiunto fino a un massimo di 545 CFU/ml) e del target complesso MTB wild-type (aggiunto a 200 CFU/ml).

Nessuna delle sostanze ha interferito con le prestazioni del test generando falsi risultati negativi, falsi risultati positivi o risultati non validi/non dichiarati.

**Tabella 20** Elenco delle sostanze endogene sottoposte al test di interferenza

Sostanza	Concentrazione	Sostanza	Concentrazione
Succhi gastrici	10% (v/v)	Mucina	5% (p/v)
Emoglobina	2 g/l	Pus	5% (v/v)
Sangue intero umano	5% (v/v)	Saliva	10% (v/v)
hDNA	4 mg/l	-	-

## Tasso globale d'errore del sistema

I campioni analizzati nello studio relativo al tasso globale d'errore del sistema erano composti da espettatorato artefatto e sedimenti di espettatorato arricchiti con un ceppo mutante del complesso MTB, portatore della mutazione prevalente S531L associata alla resistenza alla rifampicina (gene *rpoB*) e della mutazione prevalente S315T associata alla resistenza all'isoniazide (gene *katG*), fino a una concentrazione pari a circa 3 × LoD del test cobas® MTB-RIF/INH nella matrice corrispondente. Il test è stato eseguito 100 volte per ogni tipo di campione e tutte le repliche hanno prodotto risultati validi e positivi per il complesso MTB, definendo un tasso globale d'errore del sistema pari allo 0,0% con un limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale del 3,0%.

## Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata da campione a campione calcolato è stato dello 0,0% (0 su 240), alternando campioni di MTB wild-type positivi alti e campioni negativi in più sedute del test **cobas®** MTB. I test sono stati eseguiti utilizzando campioni di sedimenti di espettorato artefatti arricchiti con il complesso MTB target a  $2 \times 10^6$  CFU/ml, una concentrazione del campione che genera valori Ct più precocemente che nel 95% dei campioni dei pazienti infetti nella popolazione destinataria del test.

## Prestazioni con i campioni clinici

Le prestazioni del test **cobas®** MTB-RIF/INH con i campioni clinici sono state valutate analizzando campioni raccolti con finalità prospettiche e campioni archiviati (espettorato grezzo e sedimenti di espettorato trattati con NaOH-NALC), appartenenti a soggetti con presunta TB e provenienti da Perù, Ucraina, Russia, Sudafrica e Uganda. È stato eseguito un esame comparativo con il test di resistenza Abbott RealTime MTB RIF/INH.

I risultati sono riportati nella Tabella 21 e nella Tabella 22.

**Tabella 21** Sensibilità e specificità del test **cobas®** MTB-RIF/INH con i campioni clinici - resistenza a RIF

		Roche <b>cobas® MTB-RIF/INH</b>	Abbott <b>Test di resistenza RealTime MTB RIF/INH</b>
<b>Sensibilità</b>	<b>Espettorato grezzo</b>	116/120 <b>96,7%</b> [91,7-99,1%]	115/120 <b>95,8%</b> [90,5-98,6%]
<b>Sensibilità</b>	<b>Sedimenti</b>	23/23 <b>100%</b> [85,2-100%]	23/23 <b>100%</b> [85,2-100%]
<b>Sensibilità</b>	<b>Misti</b>	139/143 <b>97,2%</b> [93,0-99,2%]	138/143 <b>96,5%</b> [92,0-98,9%]
<b>Specificità</b>	<b>Espettorato grezzo</b>	331/338 <b>97,9%</b> [95,8-99,2%]	329/338 <b>97,3%</b> [95,0-98,8%]
<b>Specificità</b>	<b>Sedimenti</b>	219/220 <b>99,5%</b> [97,5-100%]	219/220 <b>99,5%</b> [97,5-100%]
<b>Specificità</b>	<b>Misti</b>	550/558 <b>98,6%</b> [97,2-99,4%]	548/558 <b>98,2%</b> [96,7-99,1%]
<b>Valore predittivo positivo</b>	<b>Espettorato grezzo</b>	116/123 <b>94,3%</b> [88,6-97,7%]	115/124 <b>92,7%</b> [86,7-96,6%]
<b>Valore predittivo positivo</b>	<b>Sedimenti</b>	23/24 <b>95,8%</b> [78,8-99,9%]	23/24 <b>95,8%</b> [78,8-99,9%]
<b>Valore predittivo positivo</b>	<b>Misti</b>	139/147 <b>94,5%</b> [89,5-97,6%]	138/148 <b>93,2%</b> [87,9-96,7%]
<b>Valore predittivo negativo</b>	<b>Espettorato grezzo</b>	331/335 <b>98,8%</b> [97,0-99,7%]	329/334 <b>98,5%</b> [96,6-99,5%]
<b>Valore predittivo negativo</b>	<b>Sedimenti</b>	219/219 <b>100%</b> [98,3-100%]	219/219 <b>100%</b> [98,3-100%]
<b>Valore predittivo negativo</b>	<b>Misti</b>	550/554 <b>99,3%</b> [98,3-99,8%]	548/553 <b>99,1%</b> [97,9-99,7%]

**Tabella 22** Sensibilità e specificità del test **cobas®** MTB-RIF/INH con i campioni clinici - resistenza a INH

		Roche <b>cobas® MTB-RIF/INH</b>	Abbott <b>Test di resistenza RealTime MTB RIF/INH</b>
<b>Sensibilità</b>	<b>Espettorato grezzo</b>	150/154 <b>97,4%</b> [93,5-99,3%]	147/154 <b>95,5%</b> [90,9-98,2%]
<b>Sensibilità</b>	<b>Sedimenti</b>	35/37 <b>94,6%</b> [81,8-99,3%]	32/37 <b>86,5%</b> [71,2-95,5%]
<b>Sensibilità</b>	<b>Misti</b>	185/191 <b>96,9%</b> [93,3-98,8%]	179/191 <b>93,7%</b> [89,3-96,7%]
<b>Specificità</b>	<b>Espettorato grezzo</b>	297/299 <b>99,3%</b> [97,6-99,9%]	297/299 <b>99,3%</b> [97,6-99,9%]
<b>Specificità</b>	<b>Sedimenti</b>	206/207 <b>99,5%</b> [97,3-100%]	206/207 <b>99,5%</b> [97,3-100%]
<b>Specificità</b>	<b>Misti</b>	503/506 <b>99,4%</b> [98,3-99,9%]	503/506 <b>99,4%</b> [98,3-99,9%]
<b>Valore predittivo positivo</b>	<b>Espettorato grezzo</b>	150/152 <b>98,7%</b> [95,3-99,8%]	147/149 <b>98,7%</b> [95,2-99,8%]
<b>Valore predittivo positivo</b>	<b>Sedimenti</b>	35/36 <b>97,2%</b> [85,5-99,9%]	32/33 <b>97,0%</b> [84,2-99,9%]
<b>Valore predittivo positivo</b>	<b>Misti</b>	185/188 <b>98,4%</b> [95,4-99,7%]	179/182 <b>98,4%</b> [95,3-99,7%]
<b>Valore predittivo negativo</b>	<b>Espettorato grezzo</b>	297/301 <b>98,7%</b> [96,6-99,7%]	297/304 <b>97,7%</b> [95,3-99,1%]
<b>Valore predittivo negativo</b>	<b>Sedimenti</b>	206/208 <b>99,0%</b> [96,6-100%]	206/211 <b>97,6%</b> [94,6-99,2%]
<b>Valore predittivo negativo</b>	<b>Misti</b>	503/509 <b>98,8%</b> [97,5-99,6%]	503/515 <b>97,7%</b> [96,0-98,9%]

## Equivalenza dei sistemi/confronto tra sistemi

L'equivalenza tra i **cobas®** 5800, **cobas®** 6800 e **cobas®** 8800 Systems è stata dimostrata attraverso alcuni studi sulle prestazioni. I risultati presentati nelle Istruzioni per l'uso dimostrano l'equivalenza delle prestazioni tra tutti i sistemi.

# Informazioni supplementari

## Caratteristiche specifiche del test

### Tipi di campioni

- Espettorato grezzo
- Sedimenti di espettorato e di BAL trattati con NALC-NaOH

### Quantità di campione analizzata

- Servono  $\geq 0,4$  ml di campione del paziente trattato con la soluzione MIS 1:2 (volume totale  $\geq 1,2$  ml) nella provetta campione per l'espettorato grezzo, ma lo strumento ne utilizzerà 0,85 ml
- Servono  $\geq 0,2$  ml di campione del paziente trattato con la soluzione MIS 1:5 (volume totale  $\geq 1,2$  ml) nella provetta campione per i sedimenti di espettorato e di BAL, ma lo strumento ne utilizzerà 0,85 ml

## Simboli

I seguenti simboli appaiono su tutte le confezioni dei prodotti diagnostici PCR di Roche.

**Tabella 23** Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

<b>Age/DOB</b>	Età o data di nascita		Dispositivo non idoneo ai test POC	<b>QS IU/PCR</b>	UI QS per reazione PCR; utilizzare le unità internazionali (UI) QS per la reazione PCR nel calcolo dei risultati.
 <b>SW</b>	Software ausiliario		Dispositivo non idoneo all'autodiagnosi	<b>SN</b>	Numero di serie
<b>Assigned Range [copies/mL]</b>	Intervallo assegnato (copie/mL)		Distributore <i>(Nota: il paese e/o la regione applicabili potrebbero essere indicati sotto il simbolo.)</i>	<b>Site</b>	Laboratorio
<b>Assigned Range [IU/mL]</b>	Intervallo assegnato (UI/ml)		Non riutilizzare	<b>Procedure Standard</b>	Procedura standard
<b>EC REP</b>	Mandatario nella Comunità Europea		Femmina	<b>STERILE EO</b>	Sterilizzazione con ossido di etilene
<b>BARCODE</b>	Foglio di dati del barcode		Solo per valutazione delle prestazioni IVD		Conservare al buio
<b>LOT</b>	Codice del batch	<b>GTIN</b>	Global Trade Item Number		Importatore
	Rischio biologico	<b>IVD</b>	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>		File di definizione del test
<b>REF</b>	Numero di catalogo	<b>LLR</b>	Limite inferiore dell'intervallo assegnato		Alto
	Contrassegno di conformità CE: questo dispositivo è conforme ai requisiti pertinenti del marchio CE relativamente ai dispositivi medico-diagnostici <i>in vitro</i>		Maschio	<b>Procedure UltraSensitive</b>	Procedura ultrasensibile
<b>Collect Date</b>	Data di raccolta		Fabbricante	<b>UDI</b>	Identificazione univoca del dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso	<b>CONTROL -</b>	Controllo negativo	<b>ULR</b>	Limite superiore dell'intervallo assegnato
	Contenuto sufficiente per <i>&lt;n&gt;</i> test		Non sterile	<b>Urine Fill Line</b>	Riga di riempimento urina
<b>CONTENT</b>	Contenuto del kit		Nome del paziente	<b>Rx Only</b>	Solo USA: la legge federale statunitense limita la vendita di questo dispositivo ai medici o su presentazione di prescrizione medica.
<b>CONTROL</b>	Controllo		Numero del paziente		Utilizzare entro la data
	Data di produzione		Staccare qui	<b>QS copies / PCR</b>	Copie QS per reazione PCR; usare le copie QS per reazione PCR nel calcolo dei risultati.
	Dispositivo idoneo ai test POC	<b>CONTROL +</b>	Controllo positivo		
	Dispositivo idoneo all'autodiagnosi				

## **Assistenza tecnica**

Per richiedere assistenza tecnica, contattare la nostra filiale locale:  
[https://www.roche.com/about/business/roche\\_worldwide.htm](https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm)

## **Fabbricante**

**Tabella 24** Fabbricante

Fabbricato negli USA



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany  
[www.roche.com](http://www.roche.com)

Prodotto in USA

## **Marchi e brevetti**

Vedere <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

## **Copyright**

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.



## Bibliografia

1. World Health Organization. *World Health Organization Global Tuberculosis Report 2021*. WHO: Geneva, Switzerland; 2021.
2. Sitthidet Tharinjaroen C, Intorasoot S, Anukool U, et al. Novel targeting of the *lepB* gene using PCR with confronting two-pair primers for simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium bovis*. *J Med Microbiol*. 2016;65:36-43.
3. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1296-9.
4. Novosad SA, Winthrop KL. Beyond tumor necrosis factor inhibition: the expanding pipeline of biologic therapies for inflammatory diseases and their associated infectious sequelae. *Clin Infect Dis*. 2014;58:1587-98.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR Recomm Rep*. 2000;49:1-51.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for use of an isoniazid-rifapentine regimen with direct observation to treat latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60:1650-3.
7. Orenstein EW, Basu S, Shah NS, et al. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:153-61.
8. Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *J Infect Dis*. 2015;211 Suppl 2:S21-8.
9. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8.
10. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7.
11. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
12. Chosewood LC, Wilson DE, eds. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. US Department of Health and Human Services; 2009.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections*. 4th ed. M29-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA; 2014.
14. World Health Organization. *Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual*. WHO: Geneva, Switzerland; 2012.
15. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. Centers for Disease Control: Atlanta, GA; 1985.

## Revisione del documento

<b>Informazioni sulla revisione del documento</b>	
Doc Rev. 1.0 10/2022	Prima pubblicazione.

Per prendere visione del report sintetico sulla sicurezza e sulle prestazioni, utilizzare il seguente collegamento:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>