

cobas[®] MTB

Test degli acidi nucleici per l'uso sui cobas[®] 5800/6800/8800 Systems

Per uso diagnostico *in vitro*

cobas[®] MTB

P/N: 09040579190

Per l'utilizzo sul sistema cobas[®] 5800

cobas[®] MTB Positive Control Kit

P/N: 09040587190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Per l'utilizzo sui sistemi cobas[®] 6800/8800

cobas[®] MTB Positive Control Kit

P/N: 07544812190 oppure
P/N: 09040587190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 oppure
P/N: 09051953190

Indice generale

Uso previsto	4
Riassunto e spiegazione del test.....	4
Reagenti e materiali	7
Reagenti e controlli cobas® MTB.....	7
Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni.....	9
Requisiti per la conservazione dei reagenti.....	10
Requisiti per la manipolazione dei reagenti per il cobas® 5800 System	10
Requisiti per la manipolazione dei reagenti per i cobas® 6800/8800 Systems.....	11
Altri materiali necessari per il cobas® 5800 System	12
Altri materiali richiesti per i cobas® 6800/8800 Systems.....	12
Strumentazione e software necessari	13
Precauzioni e requisiti per l'uso.....	14
Avvertenze e precauzioni	14
Manipolazione dei reagenti.....	15
Buone pratiche di laboratorio.....	15
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni	16
Campioni.....	16
Trasporto e conservazione dei campioni	16
Conservazione dei campioni inattivati.....	16
Istruzioni per l'uso.....	17
Note sulla procedura.....	17
Trattamento dei campioni di espettorato grezzo.....	19
Trattamento dei sedimenti di espettorato e di BAL	20
Sonicazione dei campioni.....	21
Esecuzione del test cobas® MTB sul cobas® 5800 System.....	22
Esecuzione del test cobas® MTB sui cobas® 6800/8800 Systems	24

Risultati	25
Controllo di qualità e validità dei risultati sul cobas ® 5800 System	25
Risultati dei controlli sul cobas ® 5800 System.....	25
Controllo di qualità e validità dei risultati sui cobas ® 6800/8800 Systems	25
Interpretazione dei risultati	26
Interpretazione dei risultati sul cobas ® 5800 System.....	26
Interpretazione dei risultati sui cobas ® 6800/8800 Systems	27
Limiti della procedura	27
Valutazione delle prestazioni	30
Caratteristiche delle prestazioni chiave sui cobas ® 6800/8800 Systems	30
Inattivazione del campione	30
Limite di sensibilità (LoD).....	30
Inclusività.....	31
Precisione.....	31
Specificità analitica/reattività crociata	33
Interferenze.....	35
Tasso globale d'errore del sistema	37
Contaminazione crociata.....	37
Prestazioni con i campioni clinici	37
Equivalenza dei sistemi/confronto tra sistemi.....	39
Informazioni supplementari.....	40
Caratteristiche specifiche del test	40
Simboli.....	41
Assistenza tecnica.....	42
Fabbricante.....	42
Marchi e brevetti.....	42
Copyright.....	42
Bibliografia	43
Revisione del documento	44

Uso previsto

Il test cobas® MTB per l'uso sui cobas® 5800/6800/8800 Systems è un esame diagnostico in vitro qualitativo automatizzato che utilizza la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) per la determinazione diretta del DNA del complesso *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Viene eseguito su campioni respiratori umani, tra i quali l'espettorato grezzo, l'espettorato e i sedimenti ottenuti dal lavaggio broncoalveolare (BAL) trattati e decontaminati con N-acetilcisteina/NaOH [NALC-NaOH].

Il test è destinato all'uso con campioni di pazienti affetti da sospetta infezione da *Mycobacterium tuberculosis* che non seguono una terapia antitubercolare. L'uso previsto del test è come ausilio nella diagnosi di tubercolosi polmonare, in associazione con altri risultati di laboratorio e in considerazione dei sintomi e dei segni clinici.

Riassunto e spiegazione del test

Premessa

La tubercolosi è un'infezione batterica causata dal MTBC. Oltre ad essere uno dei grandi problemi sanitari a livello globale, la tubercolosi è la principale causa dei decessi per malattie infettive nel mondo.^{1,2} L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che circa un quarto della popolazione mondiale sia infetta da MTB, con una stima di 9,9 milioni di nuove infezioni da TB e 1,5 milioni di decessi nel 2020.¹ Circa l'8% del totale delle infezioni da TB si è verificato nelle persone che convivono con HIV/AIDS (PLWA) e sono stati stimati 214.000 decessi in questa popolazione.¹

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.³ Gli altri componenti del complesso MTB, a parte *M. bovis* e *M. tuberculosis*, sono più raramente causa di infezione 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.⁴

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"⁵ (inibitori del TNF) o ha un'infezione da HIV.^{6,7} 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 colturali dei micobatteri, oltre che per i test di amplificazione degli acidi nucleici (*Nucleic Acid Amplification Testing*, NAAT). È fondamentale che vengano eseguiti gli esami colturali 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.

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. La terapia per la tubercolosi farmaco-resistente e multi-resistente (MDR-TB) è complessa e, rispetto ai soggetti con forme di TB sensibili ai farmaci, richiede la somministrazione di diversi farmaci tossici per periodi di tempo più lunghi, con minori probabilità di successo.⁸ Il trattamento delle forme più gravi di TB poliresistente, come la tubercolosi estensivamente resistente ai farmaci (XDR-TB), è associato a esiti peggiori rispetto alla MDR-TB.¹

La diagnosi di TB può basarsi sul quadro clinico, sugli esiti degli esami radiografici e di laboratorio (tra cui strisci AFB, esami colturali di micobatteri) e sui test NAAT. Inoltre è possibile eseguire test che misurano la risposta di anticorpi o antigeni, ad esempio i test cutanei tubercolinici (*Tuberculin Skin Test*, TST) e i test di rilascio dell'interferone gamma (*Interferon-gamma [INF γ]-Release Assay*, IGRA).² 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 causativo nell'esame colturale 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.²

Spiegazione del test

Il test cobas® MTB per l'uso sui cobas® 5800/6800/8800 Systems è un esame real-time PCR qualitativo e automatizzato, concepito per rilevare il DNA del complesso MTB in campioni respiratori umani, inclusi campioni di espettorato grezzo e sedimenti di espettorato e lavaggio broncoalveolare (BAL) trattati con NALC-NaOH e decontaminati. Il DNA di controllo interno, utilizzato per monitorare l'intero processo di preparazione del campione e di amplificazione PCR sui cobas® 5800/6800/8800 Systems, deve essere aggiunto a ogni campione durante il trattamento. Il test prevede anche l'uso di un controllo positivo con titolo basso e un controllo negativo.

Principi della procedura

Il test **cobas**® MTB si basa su una fase preanalitica in cui il campione viene liquefatto e il micobatterio viene reso inattivo, dopodiché il campione viene sottoposto a sonicazione, preparazione totalmente automatizzata (estrazione e purificazione degli acidi nucleici), amplificazione PCR e rilevazione. La liquefazione del campione e l'inattivazione del micobatterio avvengono simultaneamente nella fase di 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.

Vengono estratti simultaneamente gli acidi nucleici dei campioni dei pazienti, dei controlli esterni e delle molecole aggiunte del DNA di controllo interno (DNA-IC). In sintesi, l'acido nucleico batterico viene rilasciato attraverso la degradazione chimica (**cobas**® Microbial Inactivation Solution [MIS], **cobas** **omni** Lysis Reagent), enzimatica (proteinasasi) 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.

L'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target estratto dal campione è ottenuta utilizzando i primer forward e reverse specifici per il complesso MTB, che vengono selezionati da regioni altamente conservate all'interno dell'organismo target corrispondente. Il complesso MTB viene rilevato da due set selettivi di primer e due sonde che hanno come target due regioni distinte (doppio target, gene 16S rRNA e geni *esx*: *esxJ*, *esxK*, *esxM*, *esxP* e *esxW*). L'amplificazione selettiva del DNA-IC è ottenuta utilizzando i primer forward e reverse specifici per le sequenze, che vengono selezionati in modo tale da non presentare nessuna omologia con le regioni target del complesso MTB. Per l'amplificazione PCR viene utilizzato un enzima DNA polimerasi termostabile. Le sequenze del target e del DNA-IC vengono amplificate simultaneamente mediante un profilo di amplificazione PCR universale, che prevede valori predefiniti per la temperatura e per il numero di 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.⁹ 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 contiene due sonde di rilevazione specifiche per le sequenze target del complesso MTB e una sonda specifica per lo standard DNA-IC. Le sonde target-specifiche sono marcate con fluorocromi reporter differenti, così da consentire la rilevazione simultanea del target del complesso MTB e del DNA-IC in due diversi canali target.^{10,11} 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. Per ottenere la rilevazione real-time e la discriminazione dei prodotti della PCR, viene misurata la fluorescenza dei fluorocromi reporter liberati rispettivamente per i target del complesso MTB e del DNA-IC.

Reagenti e materiali

Reagenti e controlli cobas® MTB

I materiali forniti per il test cobas® MTB 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 10.

Per informazioni sui pericoli relativi al prodotto, consultare i paragrafi **Reagenti e materiali** e **Precauzioni e requisiti per l'uso**.

Tabella 1 cobas® MTB

cobas® MTB

Conservare a 2-8°C

Cassetta per 384 test (P/N 09040579190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit
Soluzione proteinasi (PASE)	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.	38 ml
Controllo Interno DNA (DNA-IC)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% costruito di DNA non correlato a MTB, 0,002% Poly rA RNA (sintetico), < 0,1% sodio azide	38 ml
Tampone di eluizione (EB)	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	38 ml
Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	14,5 ml
MTB Master Mix Reagente 2 (MTB MMX-R2)	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 forward e reverse di controllo interno, < 0,01% primer MTB upstream e downstream, < 0,01% sonde oligonucleotidiche fluorescenti specifiche per il complesso MTB e il DNA di controllo interno, < 0,01% aptamero oligonucleotidico	17,5 ml

Tabella 2 cobas® MTB Positive Control Kit**cobas® MTB Positive Control Kit**

Conservare a 2-8°C

Per l'utilizzo sul sistema **cobas®** 5800 (P/N 09040587190)Per l'utilizzo sui sistemi **cobas®** 6800/8800 (P/N 07544812190 o P/N 09040587190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit
Controllo positivo MTB (MTB (+) C)	Tampone Tris, < 0,05% sodio azide, < 0,05% EDTA, 0,002% Poly rA, < 0,01% DNA plasmidico non infettivo (batterico) contenente la sequenza genomica di <i>M. tuberculosis</i>	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
cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)	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**
cobas omni MGP Reagent (MGP) 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
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservare a 2-8°C (P/N 06997511190)	Tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	4 × 875 ml	Non applicabile
cobas omni Lysis Reagent (LYS) 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>PERICOLO</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.</p> <p>EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. EUH071: Corrosivo per le vie respiratorie.</p> <p>P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere 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 ANTIVELENI/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 ANTIVELENI/un medico. P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito.</p> <p>593-84-0 Tiocianato di guanidinio 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo</p>
cobas omni Wash Reagent (WASH) 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. 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 o miscela pericolosa.

Requisiti per la conservazione 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
cobas ® MTB	2-8°C
cobas ® MTB Positive Control Kit	2-8°C
cobas ® Buffer Negative Control Kit	2-8°C
cobas omni Lysis Reagent	2-8°C
cobas omni MGP Reagent	2-8°C
cobas omni Specimen Diluent	2-8°C
cobas omni 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. Nella Tabella 6 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
cobas ® MTB	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 36 giorni ^b
cobas ® MTB Positive Control Kit	Data non superata	Non applicabile ^a	Non applicabile	Max 36 giorni ^b
cobas ® Buffer Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile ^a	Non applicabile	Max 36 giorni ^b
cobas omni Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento ^b	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento ^b	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento ^b	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento ^b	Non applicabile	Non applicabile

^a Reagenti monouso

^b 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)
cobas® MTB	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 40 ore
cobas® MTB Positive Control Kit	Data non superata	Non applicabile ^a	Non applicabile	Max 10 ore
cobas® Buffer Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile ^a	Non applicabile	Max 10 ore
cobas omni Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento ^b	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento ^b	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento ^b	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento ^b	Non applicabile	Non applicabile

^a Reagenti monouso

^b 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
cobas omni Processing Plate 24	08413975001
cobas omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Puntale CORE TIPS con filtro, 1 ml	04639642001
Puntale CORE TIPS con filtro, 300 µl	07345607001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni 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
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni 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 × 13 mm, tappo a vite, fondo tondo (provetta Sarstedt P/N 60.504.010, tappo a vite 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 × g, compatibile con provette 75 × 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 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 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 del cobas® 5800 System e il pacchetto di analisi cobas® MTB 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 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.¹²⁻¹⁴ Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test cobas® MTB 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 B3¹² secondo le linee guida o i regolamenti locali e istituzionali¹⁴ 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.
- In caso di fuoriuscita dei campioni nella soluzione MIS (che contiene tiocianato di guanidinio), evitare che il liquido entri in contatto con 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 della contaminazione da carryover durante la manipolazione e l'elaborazione 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.
- I reagenti **cobas omni** Lysis Reagent e 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 i reagenti **cobas omni** Lysis Reagent e 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, **cobas®** MTB 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 3¹² o in un altro ambiente con controllo della biosicurezza, secondo le linee guida o i regolamenti locali e istituzionali¹⁴ 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, in conformità alle linee guida dell'ente. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli. Occorre sostituire i guanti quando si manipolano i campioni e i reagenti dei **cobas®** MTB, **cobas®** MTB Positive Control Kit, **cobas®** Buffer Negative Control Kit e **cobas omni** per prevenire la contaminazione.
- 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 versamenti di liquidi sui **cobas®** 5800/6800/8800 Systems, pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente dei **cobas®** 5800 o **cobas®** 6800/8800 Systems.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

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

Campioni

Il test cobas® MTB 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/scongelo.

Per l'eventuale spedizione, imballare ed etichettare i campioni come previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni infettivi 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/scongelo, 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 **cobas**® MTB, **cobas**® MTB Positive Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit, MIS o i reagenti **cobas** **omni** dopo la data di scadenza.
- 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 sui **cobas**® 5800/6800/8800 Systems, è necessario trattare i campioni attenendosi alle istruzioni contenute nei seguenti paragrafi: “Trattamento dei campioni di espettorato grezzo” o “Trattamento dei sedimenti di espettorato e BAL” e “Sonicazione dei campioni”. I flussi di lavoro brevi per i campioni di espettorato 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 mediante MIS deve essere eseguita in una cabina di sicurezza biologica (BSC) all'interno di un livello di biosicurezza 3 o con altre misure di biosicurezza in linea con le linee guida o i regolamenti locali e istituzionali e sulla base di un'adeguata valutazione del rischio.

Nota: la sonicazione dei campioni trattati con la soluzione MIS deve essere eseguita all'interno di un laboratorio BSL-2 o in un altro ambiente con controllo della biosicurezza, conformemente alle linee guida dell'ente e ai regolamenti locali.

Tabella 12 Flusso di lavoro per i campioni di espettorato grezzo

BSL-3 (BSC)	1				Aggiungere 2 parti di soluzione MIS a 1 parte di espettorato 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
BSL-2	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 × 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: espettorato 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	  		<p>Aggiungere 5 parti di soluzione MIS a 1 parte di campione di sedimenti</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 ml di soluzione MIS per 1 test (campione di sedimenti di 0,2 ml) • 2 ml di soluzione MIS per 2 test (campione di sedimenti di 0,4 ml) • 3 ml di soluzione MIS per 3 test (campione di sedimenti di 0,6 ml)
	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
BSL-2	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 × 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 espettorato grezzo

- Verificare che il contenitore dell'espettorato sia etichettato correttamente e che contenga almeno 0,4 ml di espettorato. 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 espettorato e aggiungere circa 2 parti di soluzione MIS a 1 parte di espettorato (ad esempio, 2 ml di soluzione MIS per 1 ml di espettorato) stimando il volume ad occhio e utilizzando una pipetta monouso. Richiudere bene il contenitore dell'espettorato.
- 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 espettorato 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 espettorato 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'espettorato e sulla provetta secondaria da 5 ml corrispondano.
Nota: vedere la Tabella 14.
- Prima di eseguire il test **cobas**® MTB, sonicare il campione inattivato come descritto nel paragrafo “Sonicazione dei campioni”.

Trattamento dei sedimenti di espettorato e di BAL

- Verificare che il contenitore dei sedimenti di espettorato e 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, sonicare il campione inattivato come descritto nel paragrafo “Sonicazione dei campioni”.

Tabella 14 Volumi dei campioni trattati con **cobas®** Microbial Inactivation Solution (MIS) per il test **cobas®** MTB

N. di test da eseguire dalla provetta secondaria	Volume min richiesto di campione trattato con MIS	Volume max consentito 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, 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 dello strumento 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 sia dotata di un'etichetta barcode.

Nota: assicurarsi che tutte le cinque posizioni delle provette sul rack MPA siano occupate. Se si hanno a disposizione meno di cinque provette contenenti i campioni trattati con la soluzione MIS, nelle posizioni vuote occorre inserire provette etichettate e dello stesso tipo, dopo averle 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 oppure conservati alle condizioni descritte nel paragrafo “Conservazione dei campioni inattivati”.

Esecuzione del test **cobas**® MTB sul **cobas**® 5800 System

Il test **cobas**® MTB 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. Nella Figura 2 è illustrata una sintesi della 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 $3000 \times g$.
- 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 sul cobas® 5800 System

1	Eeguire la procedura di accesso al sistema
2	<p>Caricamento dei campioni sul sistema</p> <ul style="list-style-type: none">• Stappare le provette• Trasferire la provetta direttamente nel rack• Caricare i rack per campioni sul sistema• Il sistema si prepara automaticamente• Ordinare i test<ul style="list-style-type: none">• 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	<p>Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema</p> <ul style="list-style-type: none">• 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	<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">• 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 sui cobas® 6800/8800 Systems

Il test cobas® MTB 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. Nella Figura 3 è illustrata una sintesi della 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 (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 dai cobas® 6800/8800 Systems.

Figura 3 Procedura del test cobas® MTB sui cobas® 6800/8800 Systems

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

Risultati

Il test **cobas**® MTB rileva automaticamente il DNA del complesso MTB nei campioni e nei controlli, visualizzando la validità del test oltre ai risultati per i singoli target.

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

- Un controllo negativo [(-) Ctrl] e un controllo positivo [MTB (+) 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 (+) 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 del batch viene eseguita automaticamente dal software **cobas**® 6800/8800 sulla base delle prestazioni del controllo negativo e del controllo positivo, mentre la validazione dei risultati dei singoli campioni viene eseguita dal software **cobas**® 6800/8800 sulla base dei risultati del controllo interno.

Interpretazione dei risultati

Nella Tabella 15 sono riportati i risultati e l'interpretazione corrispondente ai fini della rilevazione del DNA di MTB.

Tabella 15 Risultati e interpretazione del test **cobas®** MTB

Target 1	Interpretazione
MTB Positive	Il risultato richiesto era valido. Segnale target rilevato per il DNA del complesso <i>M. tuberculosis</i> .
MTB Negative	Il risultato richiesto era valido. Nessun segnale target rilevato per il DNA del complesso <i>M. tuberculosis</i> .
Invalid	Il risultato per MTB non è valido. Il campione originale deve essere analizzato di nuovo per ottenere risultati validi per MTB. Se il risultato continua a non essere valido ed è possibile escludere un errore dello strumento, reperire un nuovo campione.

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 sul **cobas®** 5800 System

ID campione	Test	Risultato di controllo	Flag	Stato	Risultato	Data/ora creazione
MTB_S_pos_02	MTB	Valid		Released	MTB Positive (Ct 37.99)	5/12/2022 3:44:55 PM
MTB_S_pos_01	MTB	Valid		Released	MTB Positive (Ct 38.76)	5/12/2022 3:44:55 PM
MTB_S_neg_02	MTB	Valid		Released	MTB Negative	5/12/2022 3:44:56 PM
MTB_S_neg_01	MTB	Valid		Released	MTB Negative	5/12/2022 3:44:56 PM
MTB_S_inv_01	MTB	Valid		Released	MTB Invalid	5/12/2022 1:41:06 PM
MTB_RS_pos_02	MTB	Valid		Released	MTB Positive (Ct 39.32)	5/12/2022 3:44:54 PM
MTB_RS_pos_01	MTB	Valid		Released	MTB Positive (Ct 39.53)	5/12/2022 3:44:54 PM

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 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”.
- I risultati del test devono essere interpretati contestualmente alle altre informazioni raccolte attraverso la valutazione clinica del paziente e la relativa anamnesi.

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

Test	ID campione	Valido	Flag	Tipo di campione	Risultato totale	Target 1
MTB 850 µl	TB_R_0001	NA		Raw sputum	NA	MTB Negative
MTB 850 µl	TB_R_0002	NA		Raw sputum	NA	MTB Positive
MTB 850 µl	TB_R_0003	NA	P02T	Raw sputum	NA	Invalid
MTB 850 µl	TB_S_0001	NA		Sediment	NA	MTB Negative
MTB 850 µl	TB_S_0002	NA		Sediment	NA	MTB Positive
MTB 850 µl	TB_S_0003	NA	C02H1	Sediment	NA	Invalid
MTB 850 µl	C161420284090428828404	Yes		(-) Ctrl	Valid	Valid
MTB 850 µl	C161420284093009580264	Yes		MTB (+) C	Valid	Valid

Limiti della procedura

- Il test **cobas®** MTB deve essere eseguito sempre contestualmente a una coltura dei micobatteri, sia per limitare il rischio di risultati falsi negativi, sia per consentire lo svolgimento del test di suscettibilità ai farmaci (DST) dell'isolato di MTBC e contribuire così alla buona gestione del paziente.
- Le prestazioni del test **cobas®** MTB sono state validate per i campioni di espettorato grezzo e di sedimenti di espettorato e di BAL precedentemente liquefatti, decontaminati e concentrati utilizzando NALC-NaOH. L'uso di altri tipi di campioni potrebbe determinare falsi positivi, falsi negativi e/o risultati non validi.

- La digestione e la decontaminazione devono essere eseguite secondo le procedure NALC-NaOH raccomandate dal CDC.¹⁵ 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 è stato validato con campioni di espettorato grezzo e con campioni di sedimenti di espettorato e BAL trattati con NALC-NaOH, 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 espettorato grezzo”, “Trattamento dei sedimenti di espettorato 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 stabilire l'efficacia o meno di una terapia.
- 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 è stato oggetto di valutazione soltanto in associazione con **cobas**® MTB 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 non è stato oggetto di valutazione con pazienti di età inferiore ai 18 anni.
- Il test **cobas**® MTB non è destinato all'uso con campioni respiratori, né per il monitoraggio della risposta alla terapia, né come esame di fine cura.
- Il test **cobas**® MTB non discrimina tra le varie specie del complesso MTB e tra organismi vitali e non vitali.
- L'identificazione del DNA di *M. tuberculosis* dipende dal numero di organismi presenti nel campione e può essere influenzata dal metodo di prelievo del campione e da fattori legati al paziente (ad esempio età, gravità dell'infezione, condizione HIV).
- Nel caso di pazienti infetti sia da MTB che da HIV, ci sono maggiori probabilità che l'analisi microscopica dello striscio sia negativa e che quindi il DNA del complesso MTB risulti presente a livelli inferiori al limite di sensibilità del test.
- Gli operatori sanitari deve pertanto interpretare i risultati tenendo conto della storia del paziente, del quadro clinico generale e degli esiti degli esami radiografici e di laboratorio.
- L'inibizione della polimerasi potrebbe causare risultati falsi negativi o non validi. Il controllo interno è incluso nel test **cobas**® MTB per favorire l'identificazione dei campioni contenenti sostanze che potenzialmente possono interferire con l'estrazione degli acidi nucleici e l'amplificazione PCR.
- Sebbene l'aggiunta dell'enzima AmpErase al reagente Master Mix **cobas**® MTB 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.
- Anche se rare, le mutazioni nelle regioni altamente conservate del DNA genomico del complesso *M. tuberculosis* coperte dai primer e/o dalle sonde del test **cobas**® MTB potrebbero ostacolare l'identificazione del batterio.

- A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, è consigliabile che gli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, svolgano studi sulla correlazione tra i metodi nei propri laboratori allo scopo di 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'uso di provette diverse da quelle raccomandate nella Tabella 10 deve essere validato dall'utente prima dell'implementazione nel flusso di lavoro **cobas**® MTB nel laboratorio. L'uso di altri tipi di provette potrebbe causare danni alle provette stesse e contaminare la superficie del sonificatore. Potrebbero inoltre essere generati risultati falsi negativi a causa del trasferimento di energia di sonicazione insufficiente.
- L'uso di barcode diversi da quelli raccomandati nella Tabella 10 deve essere validato dall'utente prima dell'implementazione nel flusso di lavoro **cobas**® MTB nel 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 5×10^7 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 è stato calcolato analizzando le diluizioni seriali di due ceppi del complesso MTB (*M. tuberculosis* CDC268 e *M. bovis* BCG, BCG 1st WHO Reference Reagent for BCG vaccine of Danish 1331 sub-strain), ciascuno in due matrici cliniche negative in pool: espettorato grezzo ed espettorato/sedimenti di BAL. I pannelli, costituiti da 7-9 livelli di concentrazione più un bianco, sono stati analizzati in totale 72 volte per livello di concentrazione, utilizzando tre lotti di reagenti del test cobas® MTB in più sedute, giorni, operatori e strumenti.

Il limite LoD di *M. tuberculosis* era compreso tra 7,6 CFU/ml (sedimenti di espettorato e BAL) e 8,8 CFU/ml (espettorato grezzo).

Il limite LoD di *M. bovis* BCG era compreso tra 0,9 CFU/ml (sedimenti di espettorato e BAL) e 1,0 CFU/ml (espettorato grezzo).

Inclusività

L'inclusività del test **cobas**® MTB per dieci membri del complesso MTB è stata confermata analizzando i seguenti 22 ceppi:

- *M. tuberculosis* (H37 ATCC®-25177™, TB-TDR-0032, TB-TDR-0039, TB-TDR-0105, TB-TDR-0114, TB-TDR-0115, TB-TDR-0116, TB-TDR-0131, TB-TDR-0144, TB-TDR-0185, TB-TDR-0198, 80552)
- *M. bovis* BCG (ceppo secondario Tokyo 172 NIBSC 07/270 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™)
- *M. suricattae* (492, Stellenbosch University, Tygerberg, South Africa)

Tutti i ceppi sono stati rilevati a 28,2 CFU/ml nel tipo di campione sedimenti. Per *M. suricattae* è stato analizzato DNA genomico equivalente a 28,2 CFU/ml.

Precisione

La precisione intra-laboratorio è stata esaminata utilizzando un pannello composto da colture di *M. tuberculosis* (CDC268) e *M. bovis* BCG (1st WHO Reference Reagent for BCG vaccine of Danish 1331 sub-strain) diluite in due matrici cliniche negative in pool: espettorato grezzo e sedimenti di espettorato e BAL. Le fonti di variabilità sono state esaminate utilizzando un pannello costituito da tre livelli di concentrazione, con tre lotti di reagenti **cobas**® MTB e due strumenti su un arco temporale 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. L'analisi della deviazione standard e del coefficiente di variazione dei valori soglia (Ct) ottenuti dai test eseguiti sui componenti del pannello positivo (vedere la Tabella 17) ha prodotto un CV totale (%) compreso tra 1,2% e 2,6% per *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG.

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> - espettorato grezzo					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
8,8 CFU/ml	48	46	95,8%	85,7%	99,5%
26,4 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
<i>M. tuberculosis</i> - sedimenti					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
7,6 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
22,8 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
<i>M. bovis</i> BCG - espettorato grezzo					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
1,0 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
3,0 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
<i>M. bovis</i> BCG - sedimenti					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
0,9 CFU/ml	48	45	93,8%	82,8%	98,7%
2,7 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%

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> - espettorato grezzo														
8,8 CFU/ml	95,8%	33,8	0,63	1,9	0,28	0,8	0,43	1,3	0,00	0,0	0,29	0,9	0,86	2,6
26,4 CFU/ml	100,0%	32,4	0,54	1,7	0,07	0,2	0,00	0,0	0,30	0,9	0,00	0,0	0,62	1,9
<i>M. tuberculosis</i> - sedimenti														
7,6 CFU/ml	100,0%	34,9	0,35	1,0	0,09	0,3	0,14	0,4	0,19	0,5	0,00	0,0	0,43	1,2
22,8 CFU/ml	100,0%	33,9	0,36	1,1	0,22	0,6	0,00	0,0	0,17	0,5	0,06	0,2	0,46	1,4
<i>M. bovis</i> BCG - espettorato grezzo														
1,0 CFU/ml	100,0%	33,5	0,67	2,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,22	0,7	0,71	2,1
3,0 CFU/ml	100,0%	32,4	0,40	1,2	0,30	0,9	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,50	1,5
<i>M. bovis</i> BCG - sedimenti														
0,9 CFU/ml	93,8%	35,1	0,45	1,3	0,00	0,0	0,17	0,5	0,00	0,0	0,17	0,5	0,51	1,5
2,7 CFU/ml	100,0%	34,1	0,39	1,1	0,00	0,0	0,18	0,5	0,00	0,0	0,09	0,3	0,44	1,3

Specificità analitica/reattività crociata

Per valutare la specificità analitica del test cobas® MTB è stato analizzato un pannello costituito da 178 batteri, funghi e virus, inclusi quelli che più di frequente sono presenti nel tratto respiratorio. Gli organismi elencati nella Tabella 18 sono stati testati a concentrazioni di circa 1×10^6 unità/ml per i batteri e di circa 1×10^5 unità/ml per i virus. I test sono stati eseguiti con ogni potenziale organismo interferente, sia in assenza che in presenza del complesso MTB target (a 200 CFU/ml). Nessuno degli organismi ha interferito con le prestazioni del test generando risultati falsi positivi. La rilevazione del complesso MTB target non è stata influenzata dagli organismi analizzati. La potenziale reattività crociata dei bacilli *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium mantonii* 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.

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 gastri</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium gordonae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium holsaticum</i>	1,0E+06 CFU/ml
Adenovirus	1,0E+05 U/ml	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intermedium</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> sottospecie <i>subtilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kumamontoniense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bactericides fragilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycobacterium malmoense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bordetella parapertussis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marinum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bordetella pertussis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marseillense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Campylobacter jejuni</i> sottospecie <i>jejuni</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida albicans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida glabrata</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida krusei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium simiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida tropicalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,0E+06 IFU/ml	<i>Mycobacterium szulgai</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	1,0E+06 IFU/ml	<i>Mycobacterium terrae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Citrobacter freundii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium triviale</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vaccae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vulneris</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium xenopi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium yongonense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,0E+06 ccu/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria lactamica</i>	1,0E+06 CFU/ml

Microrganismo	Concentrazione	Microrganismo	Concentrazione
Citomegalovirus	1,0E+05 IFU/ml	<i>Neisseria meningitides</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Eikenella corrodens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria mucosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria sica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i> sottospecie <i>cloacae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia asteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus avium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia farcinica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Enterovirus tipo 68 / 2007	1,0E+05 U/ml	<i>Nocardia nova</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i> produttore di CTX-M-15 ESBL	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia transvalensis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sottospecie <i>nucleatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Pasteurella multocida</i> sottospecie <i>tigris</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Gordona rubropertinctus</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Penicillium chermesinum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus dell'herpes simplex tipo 1	1,0E+05 cp/ml	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus dell'herpes simplex tipo 2	1,0E+05 cp/ml	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus dell'immunodeficienza umana	1,0E+05 cp/ml	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus dell'influenza umana A	1,0E+05 U/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus dell'influenza umana B	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1,0E+06 CFU/ml
Metapneumovirus umano	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus parainfluenzale umano tipo 1	1,0E+05 U/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus parainfluenzale umano tipo 2	1,0E+05 U/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus parainfluenzale umano tipo 3	1,0E+05 U/ml	<i>Rhizopus</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
Virus parainfluenzale umano tipo 4	1,0E+05 U/ml	<i>Rhodococcus equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus respiratorio sinciziale umano A	1,0E+05 U/ml	Virus della rosolia (Rubella)	1,0E+05 U/ml
Virus respiratorio sinciziale umano B	1,0E+05 U/ml	Virus del morbillo (Rubeola)	1,0E+05 U/ml
Rinovirus umano 16	1,0E+05 U/ml	Rubulavirus	1,0E+05 U/ml
<i>Kingella kingae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Salmonella enterica</i> sottospecie <i>enterica</i> sierovariante Dublino	1,0E+06 CFU/ml
<i>Kingella oralis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Scedosporium</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Serratia marcescens</i> sottospecie <i>marcescens</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> produttore di carbapenemasi KPC-3	1,0E+06 CFU/ml	<i>Shigella flexneri</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> sottospecie <i>pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Shigella sonnei</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> sottospecie <i>aureus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus capitis</i> sottospecie <i>capitis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella micdadei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella pneumophila</i> sottospecie <i>pneumophila</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sottospecie <i>mesenteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus hominis</i> sottospecie <i>hominis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Morganella morganii</i> sottospecie <i>morganii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus constellatus</i> sottospecie <i>constellatus</i>	1,0E+06 CFU/ml

Microrganismo	Concentrazione	Microrganismo	Concentrazione
<i>Mycobacterium arosiense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus equi</i> sottospecie <i>equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Streptococcus mitis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> sottospecie <i>avium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus mutans</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> sottospecie <i>hominissuis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> sottospecie <i>silvaticum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> sottospecie <i>paratuberculosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium bouchedurhonense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus salivarius</i> sottospecie <i>salivarius</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium celatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus uberis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chimaera</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptomyces anulatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chubuense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptomyces griseus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium colombiense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Tsukamurella</i> spp.	1,0E+06 geq/ml
<i>Mycobacterium confluentis</i>	1,0E+06 CFU/ml	Virus varicella-zoster	1,0E+05 cp/ml
<i>Mycobacterium flavescens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Veillonella atypica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Veillonella parvula</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium fuerth</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Weissella paramesenteroides</i>	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 espettorato artefatto, sia in assenza che in presenza del complesso MTB target (aggiunto a 200 CFU/ml).

Nessuna delle sostanze ha interferito con le prestazioni del test generando falsi risultati negativi o falsi risultati positivi.

Tabella 19 Elenco delle sostanze esogene sottoposte al test di interferenza

Sostanza	Concentrazione	Sostanza	Concentrazione
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 µg/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	225 mg/ml	Moxifloxacina	15 µg/ml
Capreomicina	80 µg/ml	Mupirocina	5% (p/v)
Cloruro di cetilpiridinio	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 µg/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	5 mg/ml	Tobramicina	24,1 µg/ml
Isoniazide	50 µg/ml	Zanamivir	10 mg/ml

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 espettorato artefatto, sia in assenza che in presenza del complesso MTB target (aggiunto a 200 CFU/ml).

Nessuna delle sostanze ha interferito con le prestazioni del test generando falsi risultati negativi o falsi risultati positivi.

Tabella 20 Elenco delle sostanze endogene sottoposte al test di interferenza

Sostanza	Concentrazione	Sostanza	Concentrazione
Succhi gastrici	10% (v/v)	Mucina	5%
Emoglobina	2 g/l	Pus	5%
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 espettorato artefatti e sedimenti di espettorato arricchiti con il complesso MTB target a una concentrazione $3 \times \text{LoD}$ del test **cobas**® MTB nella rispettiva matrice. Dai risultati si evince che tutte le repliche del test hanno prodotto risultati validi e positivi per il complesso MTB, per un tasso globale d'errore del sistema pari allo 0% con un limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale del 3,0%.

Contaminazione crociata

Sono stati svolti alcuni studi per valutare la potenziale contaminazione crociata nei **cobas**® 6800/8800 Systems quando viene eseguito il test **cobas**® MTB. La contaminazione crociata può causare risultati falsi positivi. Dallo studio sulle prestazioni, il tasso di contaminazione crociata da campione a campione con il test **cobas**® MTB è stato fissato allo 0,0% (0 su 240) per il complesso MTB, alternando campioni positivi molto alti a campioni negativi nel corso di più sedute. I test sono stati eseguiti utilizzando campioni di sedimenti di espettorato artefatti arricchiti con il complesso MTB target a 2×10^6 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 con i campioni clinici sono state oggetto di valutazione tramite l'analisi di campioni prospettici e di archivio (espettorato grezzo, sedimenti di espettorato e BAL) ottenuti da soggetti con sospetta TB raccolti in Germania, Sudafrica, Svizzera, Uganda e Ucraina. È stato eseguito un esame comparativo con il test Abbott RealTime MTB. La sensibilità e la specificità del test sono state determinate in rapporto alla coltura dei micobatteri e allo stato dello striscio AFB.

I risultati sono illustrati nella Tabella 21. Tutti i risultati positivi per il test **cobas**® MTB ottenuti da campioni di colture negative sono stati confermati come eventi di amplificazione/rilevazione specifici generati dall'analisi degli ampliconi post-PCR.

Tabella 21 Sensibilità e specificità del test **cobas® MTB** con i campioni clinici

			Roche cobas® MTB	Abbott RealTime MTB
Sensibilità	Espettorato grezzo	C+/S-	116/134 86,6% [79,6-91,8%]	111/134 82,8% [75,4-88,8%]
		C+/S+	275/278 98,9% [96,9-99,7%]	274/278 98,5% [96,3-99,6%]
		C+/S±	391/412 94,9% [92,3-96,8%]	385/412 93,4% [90,6-95,6%]
Sensibilità	Sedimenti	C+/S-	116/148 78,4% [70,9-84,7%]	121/148 81,8% [74,6-87,6%]
		C+/S+	287/289 99,3% [97,5-99,9%]	284/289 98,2% [96,0-99,4%]
		C+/S±	403/437 92,2% [89,3-94,5%]	405/437 92,6% [89,8-94,9%]
Specificità	Espettorato grezzo	C-/S-	326/332 98,2% [96,1-99,3%]	N/A
Specificità	Sedimenti	C-/S-	381/393 96,9% [94,7-98,4%]	N/A
Valore predittivo positivo	Espettorato grezzo	P+	391/397 98,5% [96,7-99,4%]	N/A
Valore predittivo positivo	Sedimenti	P+	403/415 97,1% [95,0-98,5%]	N/A
Valore predittivo negativo	Espettorato grezzo	P-	326/347 93,9% [90,9-96,2%]	N/A
Valore predittivo negativo	Sedimenti	P-	381/415 91,8% [88,7-94,3%]	N/A

C = coltura, S = striscio AFB, P = test PCR.

Un sottoinsieme di campioni è stato analizzato presso un laboratorio di servizi clinici (*Clinical Laboratory Services, CLS*) in Sudafrica. Da ogni paziente sono stati prelevati campioni di espettorato grezzo nel corso di due visite. Un campione di espettorato grezzo è stato analizzato con i test **cobas® MTB**, Abbott *RealTime MTB* e *GeneXpert® MTB/RIF*. Un campione di espettorato grezzo è stato trattato con il metodo NALC-NaOH in modo da ottenere un sedimento ed è stato quindi analizzato con i test **cobas® MTB**, Abbott *RealTime MTB*, *GeneXpert® MTB/RIF* e *COBAS® TaqMan® MTB*. La sensibilità e la specificità del test sono state determinate in rapporto alla coltura e allo stato dello striscio AFB.

I risultati sono illustrati nella Tabella 22.

Tabella 22 Sensibilità e specificità del test **cobas®** MTB con i campioni clinici raccolti in Sudafrica

			Roche cobas® MTB	Abbott RealTime MTB	Cepheid Xpert MTB/RIF	Roche COBAS® TaqMan® MTB
Sensibilità	Espettorato grezzo	C+/S-	18/22 81,8% [59,7-94,8%]	16/22 72,7% [49,8-89,3%]	16/22 72,7% [49,8-89,3%]	N/A
		C+/S+	72/73 98,6% [92,6-100%]	72/73 98,6% [92,6-100%]	71/73 97,3% [90,5-99,7%]	N/A
		C+/S±	90/95 94,7% [88,1-98,3%]	88/95 92,6% [85,4-97,0%]	87/95 91,6% [84,1-96,3%]	N/A
Sensibilità	Sedimenti	C+/S-	17/22 77,3% [54,6-92,2%]	17/22 77,3% [54,6-92,2%]	17/22 77,3% [54,6-92,2%]	13/22 59,1% [36,4-79,3%]
		C+/S+	73/73 100% [95,1-100%]	71/73 97,3% [90,5-99,7%]	73/73 100% [95,1-100%]	73/73 100% [95,1-100%]
		C+/S±	90/95 94,7% [88,1-98,3%]	88/95 92,6% [85,4-97,0%]	90/95 94,7% [88,1-98,3%]	86/95 90,5% [82,8-95,6%]
Specificità	Espettorato grezzo	C-/S-	193/199 97,0% [93,6-98,9%]	192/199 96,5% [92,9-98,6%]	194/199 97,5% [94,2-99,2%]	N/A
Specificità	Sedimenti	C-/S-	190/199 95,5% [91,6-97,9%]	189/199 95,0% [91,0-97,6%]	196/199 98,5% [95,7-99,7%]	193/196 98,5% [95,6-99,7%]
Valore predittivo positivo	Espettorato grezzo	C+/S±	90/96 93,8% [86,9-97,7%]	88/95 92,6% [85,4-97,0%]	87/92 94,6% [87,8-98,2%]	N/A
Valore predittivo positivo	Sedimenti	C+/S±	90/99 90,9% [83,4-95,8%]	88/98 89,8% [85,4-97,0%]	90/93 96,8% [90,9-99,3%]	86/89 96,6% [90,5-99,3%]
Valore predittivo negativo	Espettorato grezzo	C-/S±	193/198 97,5% [94,2-99,2%]	192/199 96,5% [92,9-98,6%]	194/202 96,0% [92,3-98,3%]	N/A
Valore predittivo negativo	Sedimenti	C-/S±	190/195 97,4% [94,1-99,2%]	189/196 96,4% [92,8-98,6%]	196/201 97,5% [94,3-99,2%]	193/202 95,5% [91,7-97,9%]

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 sulle etichette dei prodotti Roche per la diagnostica mediante PCR

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

Assistenza tecnica

Per richiedere assistenza tecnica, contattare la nostra filiale locale:

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

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. *Global Tuberculosis Report 2021*. WHO: Geneva, Switzerland; 2021.
2. Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *J Infect Dis*. 2015;211 Suppl 2:S21-8.
3. 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.
4. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1296-9.
5. 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.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR Recomm Rep*. 2000;49:1-51.
7. Centers for Disease Control 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.
8. 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.
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

Informazioni sulla revisione del documento	
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>