

Xpert MTB/XDR®

REF GXMTB/XDR-10

Istruzioni per l'uso

IVD CE

Dichiarazioni relative a marchi di fabbrica, brevetti e copyright

Cepheid[®], the Cepheid logo, GeneXpert[®], and Xpert[®] are trademarks of Cepheid, registered in the U.S. and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT CONVEYS TO THE BUYER THE NON-TRANSFERABLE RIGHT TO USE IT IN ACCORDANCE WITH THESE INSTRUCTIONS FOR USE. NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

© 2020–2023 Cepheid.

Cepheid[®], il logo Cepheid, GeneXpert[®] e Xpert[®] sono marchi di Cepheid, registrati negli USA e in altri Paesi. Tutti gli altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO CONCEDE ALL'ACQUIRENTE IL DIRITTO NON TRASFERIBILE DI UTILIZZARLO IN ACCORDO ALLE PRESENTI ISTRUZIONI PER L'USO. NESSUN ALTRO DIRITTO VIENE CONCESSO ESPRESSAMENTE, IMPLICITAMENTE O PER PRECLUSIONE. INOLTRE, CON L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO NON VIENE CONCESSO NESSUN DIRITTO ALLA RIVENDITA.

© 2020–2023 Cepheid.

Per una descrizione delle modifiche apportate, vedere Sezione 25.

Xpert[®] MTB/XDR

Per uso diagnostico in vitro

1 Nome registrato

Xpert[®] MTB/XDR

2 Nome comune o usuale

Xpert MTB/XDR

3 Scopo previsto

3.1 Destinazione d'uso

Il test Xpert MTB/XDR, eseguito sui sistemi di strumentazione GeneXpert, è un test diagnostico *in vitro* nested-PCR (reazione a catena della polimerasi) real time qualitativo, per il rilevamento del DNA del complesso *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ad estesa farmacoresistenza (XDR) in campioni di espettorato non trattato, sedimenti concentrati preparati da espettorato o coltura BD[™] MGIT[™] (Mycobacterial Growth Indicator Tube). Nei campioni risultati positivi per MTB, il test Xpert MTB/XDR può altresì rilevare mutazioni associate a resistenza a isoniazide (INH) nei geni *katG* e *fabG1*, nella regione intergenica *oxyR-ahpC* e nel promotore di *inhA*; resistenza a etionamide (ETH) associata a mutazioni nel solo promotore di *inhA*; mutazioni associate a resistenza al fluorochinolone (FLQ) nelle regioni *gyrA* e *gyrB* determinanti resistenza al fluorochinolone (QRDR); e mutazioni nel gene *rrs* e nella regione del promotore di *eis* associate a resistenza ai farmaci iniettabili di seconda linea (Second Line Injectable Drug, SLID).

Il test Xpert MTB/XDR è destinato all'uso come test reflex per un campione (espettorato non trattato, sedimenti di espettorato concentrato o coltura MGIT) di cui sia stata determinata la positività per MTB. Questo test, usato insieme a risultati clinici e ad altri esami di laboratorio, serve come ausilio diagnostico per la tubercolosi (TB) XDR.

3.2 Utilizzatore/ambiente previsto

Il test Xpert MTB/XDR deve essere eseguito in laboratorio da operatori appositamente formati.

4 Riepilogo e spiegazione

La tubercolosi (TB), malattia provocata da *Mycobacterium tuberculosis*, rimane una delle maggiori cause di mortalità al mondo. Nel 2018 sono stati registrati 10 milioni di nuovi casi stimati di TB e circa mezzo milione di nuovi casi di TB resistente alla rifampicina, di cui il 78% presentava TB multiresistente (MDR-TB)¹. La MDR-TB, definita come resistenza a isoniazide e rifampicina (due dei più efficaci farmaci di prima linea), continua a essere una minaccia per la salute pubblica e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha pubblicato nuove linee guida sul trattamento che richiedono test rapidi di farmaco sensibilità^{2,3}. Ciononostante, nel 2018 il numero di casi mondiali di MDR/RR-TB pubblicato era ancora soltanto pari al 39% dei casi stimati e il numero di persone arruolate nel trattamento era equivalente al 32%¹. Aumenta parallelamente anche la preoccupazione verso i casi non diagnosticati e non trattati di TB resistente a isoniazide, sensibile a rifampicina. Nei Paesi in cui l'accesso ai test di resistenza all'INH è difficoltoso, identificare i pazienti e attuare le raccomandazioni terapeutiche dell'OMS nel 2018 per la Hr-TB diventa complicato⁴. I casi più preoccupanti di TB sono causati da ceppi di MTB multiresistenti (MDR) che hanno acquisito ulteriori resistenze ai fluorochinoloni e a uno qualsiasi

dei farmaci iniettabili di seconda linea, amicacina (AMK), canamicina (KAN) o capreomicina (CAP). Questi ceppi ad alta resistenza sono detti TB ad estesa farmacoresistenza (TB XDR). La TB XDR è molto difficile da trattare e può causare elevati tassi di mortalità, specialmente nei casi di mancata diagnosi o ritardo nell'instaurazione di un trattamento adeguato⁵.

La coltura e i test fenotipici di farmaco sensibilità di MTB richiedono tempo e procedure laboriose oltre a presentare un serio rischio biologico per gli operatori nei laboratori, pertanto nei Paesi in cui la MTB è endemica le strutture accreditate scarseggiano². Anche laddove siano disponibili, i test di sensibilità basati sulla coltura possono richiedere da settimane a mesi. La MTB può essere valutata per farmacoresistenza anche mediante l'impiego di saggi genotipici rapidi, sensibili e più sicuri, che rilevano la resistenza identificando la presenza di mutazioni notoriamente causa di resistenza ai farmaci di prima e seconda linea nella maggioranza dei ceppi clinici². Gli approcci ai test genotipici riducibili ad alcuni passaggi manuali si prestano maggiormente al punto di cura, il che ne aumenta in misura esponenziale la disponibilità nelle popolazioni che non godono di un'adeguata rete assistenziale in contesti ad alto o basso tasso endemico⁵.

5 Principio della procedura

Il test Xpert MTB/XDR è un test diagnostico *in vitro* per il rilevamento di DNA del complesso MTB XDR e mutazioni associate a resistenza. Il test viene eseguito su Cepheid dotato di moduli a 10 colori GeneXpert.

Il consente di integrare e automatizzare il trattamento dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento delle sequenze bersaglio in campioni, utilizzando la nested-PCR real time e il rilevamento dei picchi di fusione. Il è composto da uno strumento, un personal computer, un lettore di codici a barre e un software già installato per l'esecuzione di analisi su campioni raccolti e per la visualizzazione dei risultati. Il sistema richiede l'uso di cartucce Xpert monouso contenenti i reagenti bersaglio specifici per la reazione a catena della polimerasi (PCR) e all'interno delle quali hanno luogo il processo di PCR e il rilevamento dei picchi di fusione. Essendo le cartucce Xpert isolate ermeticamente nel contenuto, il rischio di contaminazione crociata tra i campioni è ridotto al minimo. Per una descrizione completa del sistema, consultare *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

La cartuccia del test Xpert MTB/XDR include i reagenti per il rilevamento del profilo XDR MTB oltre a un controllo per il trattamento dei campioni (SPC) utilizzato per verificare che i batteri bersaglio siano stati trattati in modo adeguato e per monitorare la presenza di sostanze inibitrici nella reazione PCR. Il controllo per la verifica della sonda (Probe Check Control, PCC) verifica la reidratazione dei reagenti, il riempimento della provetta PCR nella cartuccia, l'integrità della sonda e la stabilità del colorante.

La cartuccia del test Xpert MTB/XDR ha tutti i reagenti a bordo, eccetto il reagente per il campione (RC), che richiede l'aggiunta del campione di analisi da parte dell'utente del SR prima del caricamento del campione di analisi nella cartuccia. Il test è destinato a essere eseguito come test reflex per i campioni positivi per MTB.

I risultati vengono interpretati dal software GeneXpert in base ai segnali fluorescenti misurati e agli algoritmi di calcolo incorporati, e sono visualizzati nella finestra Visualizza risultati (View Results) nei formati grafico e tabulare. Il test segnala inoltre se il test ha generato un risultato Non valido (Invalid), un eventuale Errore (Error) o Nessun risultato (No Result). Il Xpert MTB/XDR rileva la presenza di MTB XDR con resistenza a INH, ETH, FLQ e SLID direttamente da espettorato non trattato o da espettorato sedimentato concentrato in meno di 90 minuti.

6 Materiale fornito

Il kit Xpert MTB/XDR contiene reagenti sufficienti per il trattamento di 10 campioni di analisi del paziente o campioni di analisi per il controllo qualità. Il contenuto del kit è il seguente:

Xpert MTB/XDR Cartucce con provette di reazione integrate	10 per kit
<ul style="list-style-type: none"> • Microsfera 1, microsfera 2, microsfera 3, microsfera 4, e microsfera 5 (liofilizzate) • Microsfera di controllo per il trattamento dei campioni (SPC) (liofilizzata) • Reagente 1 • Reagente 2 	1 di ciascuna per cartuccia 1 di ciascuna per cartuccia 4,0 ml per cartuccia 4,0 ml per cartuccia
Pipette di trasferimento monouso	1 busta da 12 per kit
Reagente per il campione	10 flaconi da 8 ml
CD	1 per kit

- File di definizione del saggio (ADF)
- Istruzioni per l'importazione degli ADF nel software GeneXpert
- Istruzioni per l'uso (foglietto illustrativo)

Nota Il reagente per il campione (RC) può essere incolore o di colore variabile tra giallo e ambra. Il colore può intensificarsi con il tempo ma non ha alcun effetto sulle prestazioni.

Nota Le schede dati di sicurezza (SDS) sono disponibili nel sito www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com sotto la scheda **SUPPORTO** (SUPPORT).

Nota L'albumina di siero bovino (BSA) presente nelle microsferi di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Gli animali non sono stati nutriti con proteine di ruminanti o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante e post mortem. Durante la lavorazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

Nota Le pipette di trasferimento presentano un'unica tacca corrispondente al volume minimo di campione trattato necessario per il trasferimento alla cartuccia. Utilizzarle solo per questo scopo. Tutte le altre pipette devono essere fornite dal laboratorio.

7 Conservazione e manipolazione

- Conservare il contenuto del kit Xpert MTB/XDR a 2–28 °C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.
- Aprire il coperchio della cartuccia solo immediatamente prima di eseguire il test.
- Iniziare il test entro 2,5 ore dall'aggiunta dell'RC al campione di analisi o entro 4 ore se conservato a 2-8 °C.
- Non utilizzare i reagenti o le cartucce oltre la data di scadenza.
- Non utilizzare cartucce che presentano perdite.

8 Materiali necessari ma non forniti

- GeneXpert Dx System: Strumento GeneXpert dotato di moduli GeneXpert a 10 colori, computer, lettore di codici a barre e manuale dell'operatore
 - Per GeneXpert Dx System: Software versione 6.2 o successiva
 - Stampante: se è necessaria una stampante, rivolgersi al rappresentante commerciale di Cepheid per predisporre l'acquisto della stampante consigliata.
- Contenitore del campione sterile con tappo a vite
- Guanti monouso
- Etichette e/o pennarello indelebile
- Pipette sterili per il trattamento del campione

9 Avvertenze e precauzioni

9.1 Avvertenze di carattere generale

- *Per uso diagnostico in vitro*
- Tutti i campioni biologici di analisi, comprese le cartucce usate, devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi. Poiché, nella maggior parte dei casi, è impossibile distinguere i potenziali veicoli di infezione, tutti i campioni biologici di analisi devono essere trattati attenendosi alle precauzioni standard.
- Le linee guida per il trattamento dei campioni di analisi sono disponibili presso l'ente statunitense per la prevenzione e il controllo delle malattie (U.S. Centers for Disease Control and Prevention)³ e l'istituto per gli standard clinici e di laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute).^{6,7,8}
- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto per l'utilizzo e la manipolazione di sostanze chimiche e campioni biologici.
- Per manipolare campioni di analisi e reagenti, indossare guanti protettivi monouso, camici da laboratorio e protezione per gli occhi. Lavarsi accuratamente le mani dopo avere manipolato i campioni di analisi e i reagenti del test.

- I campioni biologici di analisi, i dispositivi di trasferimento e le cartucce usate devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi adottando le precauzioni standard. Attenersi alle procedure di smaltimento dei rifiuti ambientali del proprio istituto per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati. Questi materiali potrebbero essere considerati rifiuti chimici pericolosi per il cui smaltimento sarà necessario attenersi a specifiche procedure nazionali o regionali. Se i regolamenti nazionali o regionali non forniscono istruzioni chiare sul corretto smaltimento, i campioni biologici di analisi e le cartucce usate devono essere smaltiti in base alle linee guida dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) sulla manipolazione e lo smaltimento dei rifiuti medici⁹.
- Il reagente per il campione contiene idrossido di sodio (pH > 12,5) e isopropanolo. Nocivo se ingerito (H302), provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari (H314). Liquido e vapore infiammabili (H226).
- Le caratteristiche prestazionali di questo test sono state stabilite solo con i tipi di campione di analisi specificati in Destinazione d'uso. Le prestazioni di questo test con altri tipi di campioni di analisi non sono state valutate.
- Durante il trattamento di sostanze chimiche e la manipolazione di campioni biologici, rispettare le procedure di sicurezza previste dalla struttura sanitaria di appartenenza.

9.2 Campione di analisi


- Le procedure di prelievo e manipolazione dei campioni di analisi richiedono un addestramento specifico e vanno eseguite in base a precise linee guida.
- Durante il trasporto dei campioni di analisi, mantenere le condizioni di conservazione corrette per garantire l'integrità dei campioni stessi (vedere Sezione 12. Procedura). La stabilità dei campioni di analisi in condizioni di spedizione diverse da quelle consigliate non è stata valutata.
- Scartare i campioni di analisi contenenti evidenti particelle di cibo o altre particelle solide.
- Un prelievo, una conservazione e un trasporto corretti del campione sono essenziali ai fini dell'affidabilità dei risultati.
- Il materiale colturale da un flacone di coltura MGIT positiva può essere usato non diluito o diluito 100 volte con PBS o terreni Middlebrook 7H9. Il test può anche essere eseguito con colture termoinattivate. Per quanto riguarda il processo di termoinattivazione, si consiglia di diluire prima la coltura di 100 volte con PBS o terreni Middlebrook 7H9, quindi di riscaldarla a 100 °C per 20 minuti.

9.3 Test/Reagente

- Non sostituire i reagenti del test Xpert MTB/XDR con altri reagenti.
- Aprire il coperchio della cartuccia del test Xpert MTB/XDR soltanto quando viene aggiunto il campione.
- Non usare la cartuccia se è caduta dopo essere stata estratta dal kit o se è stata agitata dopo averne aperto il coperchio. Agitando la cartuccia o facendola cadere dopo averne aperto il coperchio, si potrebbero ottenere risultati falsi o indeterminati.
- Non applicare l'etichetta con l'ID campione sul coperchio della cartuccia o sull'etichetta del codice a barre.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione è danneggiata.
- Ciascuna cartuccia monouso del test Xpert MTB/XDR viene usata per l'esecuzione di un singolo test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Ciascuna pipetta monouso viene utilizzata per trasferire un solo campione di analisi. Non riutilizzare le pipette monouso usate.
- Non usare la cartuccia se appare umida o se sembra che il sigillo del coperchio sia stato rotto.
- Si consiglia di adottare le buone pratiche di laboratorio che includono il cambio dei guanti tra la manipolazione di un campione di analisi e quello successivo al fine di evitare la contaminazione dei campioni o dei reagenti.
- In caso di fuoriuscita di campioni di analisi o di controlli, indossare dei guanti e assorbire la fuoriuscita con salviette di carta. Pulire, quindi, accuratamente l'area contaminata con una soluzione contenente candeggina per uso domestico diluita in rapporto 1:10 appena preparata. La concentrazione finale di cloro attivo deve essere dello 0,5%, indipendentemente dalla concentrazione della candeggina per uso domestico in uso nel proprio Paese. Prevedere un tempo di contatto minimo di due minuti. Accertarsi che l'area di lavoro sia asciutta prima di utilizzare l'etanolo denaturato al 70% per rimuovere i residui di candeggina. Lasciare asciugare completamente la superficie prima di proseguire. Oppure, seguire le prassi standard del proprio istituto previste in caso di contaminazione o fuoriuscita. Per le apparecchiature, seguire le raccomandazioni del produttore per la decontaminazione dell'apparecchiatura.
- Il test Xpert MTB/XDR è stato convalidato mediante l'impiego del software Cepheid versione 6.2 o successiva.

10 Pericoli chimici^{9,10}

Reagente per il campione:

- Contiene alcol isopropilico
- Contiene idrossido di sodio
- Parola: PERICOLO
- Pittogrammi di pericolo UN GHS: 
- **Indicazioni di pericolo UN GHS**
 - Liquido e vapore infiammabili.
 - Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
 - Provoca gravi lesioni oculari.
 - Sospettato di provocare alterazioni genetiche.
 - Sospettato di nuocere alla fertilità o al feto.
 - Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
- **Fraresi di prudenza UN GHS**
- **Prevenzione**
 - Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
 - Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
 - Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate. - Non fumare.
 - Tenere il recipiente ben chiuso.
 - Non respirare la nebbia, i vapori e/o gli aerosol.
 - Lavare accuratamente dopo l'uso.
 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 - Utilizzare il dispositivo di protezione individuale richiesto.
- **Risposta**
 - In caso di incendio: usare mezzi di estinzione appropriati.
 - 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 o un medico.
 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
 - Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.
 - Trattamento specifico (vedere le informazioni supplementari di pronto soccorso).
 - 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.
 - IN CASO DI INGESTIONE: Sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.
 - In caso di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico.
 - In caso di malessere, consultare un medico.
- **Stoccaggio/Smaltimento**
 - Smaltire prodotto e/o recipiente in conformità con normative locali, regionali, nazionali e/o normative internazionali.

11 Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni di analisi

I campioni di analisi possono essere prelevati seguendo le prassi standard dell'istituto.

Un prelievo, una conservazione e un trasporto corretti dei campioni di analisi sono essenziali ai fini delle prestazioni della presente analisi. La stabilità dei campioni di analisi in condizioni di spedizione e conservazione diverse da quelle consigliate nell'elenco riportato qui sotto non è stata valutata con il test Xpert MTB/XDR.

11.1 Trasporto di espettorato sedimentato

Trasporto di campioni di analisi sedimentati a 2–8 °C.

11.2 Trasporto di espettorato non trattato

I campioni di espettorato non trattato devono essere trasportati a 2–35 °C.

11.3 Conservazione dei campioni di analisi

I campioni di espettorato non trattato possono essere conservati a 2–35 °C per 7 giorni (incluso il tempo di spedizione)

L'espettorato sedimentato decontaminato/concentrato e risospeso può essere conservato (2–8 °C) per un massimo di 7 giorni fino all'esecuzione del test sul GeneXpert.

Quando si esegue il test su campioni di espettorato non trattato o di espettorato sedimentato decontaminato/concentrato, il volume corretto del campione di analisi deve essere determinato seguendo le indicazioni riportate nella Tabella 1 seguente.

Tabella 1. Volume di campione di analisi richiesto

Tipo di campione di analisi	Volume minimo per un'analisi	Volume massimo di campione	Rapporto campione di analisi:reagente per il campione (RC)
Espettorato sedimentato	0,5 ml	2,5 ml	Il rapporto campione:RC di 1:3 ^a
Espettorato non trattato	1,0 ml	4,0 ml	1:2

^a 1:2 può essere usato con un volume minimo di campione di 0,7 ml per un test.

11.4 Campioni di analisi residui trattati con l'RC

Il test Xpert MTB/XDR può essere usato per analizzare residui di campioni di analisi trattati con RC dal saggio Xpert MTB/RIF o Xpert MTB/RIF Ultra. In questi casi, tuttavia, il volume del campione di analisi residuo trattato con RC deve essere ≥2 ml e la miscela deve essere conservata a 2–8 °C per non più di 4 ore o a una temperatura massima di 35 °C per non più di 2,5 ore.

11.5 Isolati di coltura da provetta BD MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube)

Risultati validi sono stati generati durante lo studio clinico con il test Xpert MTB/XDR utilizzando colture positive per MTB da una provetta MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube). Per l'analisi di isolati di MTB da flaconi di coltura positivi per MGIT, usare almeno 1,0 ml di materiale colturale.

Nota Le colture di micobatteri da campioni di analisi clinici devono essere maneggiate nel rispetto di adeguate misure di contenimento per la biosicurezza.

Prima di cominciare il test, procedere secondo un rapporto campione:RC 1:2 dopo un'incubazione di 15 minuti mediante vortex per 10 secondi ogni 5 minuti, al fine di prevenire il rischio di sedimentazione, oppure continuare ad agitare. Cominciare la sessione del test GeneXpert entro 30 minuti dall'aggiunta di 2 ml di RC al materiale colturale.

12 Procedura

12.1 Procedura per espettorato non trattato

Importante Iniziare il test entro 2,5 ore dall'aggiunta dell'RC al campione di analisi o entro 4 ore se conservato a 2-8 °C.

Nota Scartare i campioni di analisi contenenti evidenti particelle di cibo o altre particelle solide.

Requisiti di volume: sono necessari ≥ 1 ml di espettorato non trattato.

1. Aprire con cautela il coperchio del contenitore a tenuta stagna di raccolta dell'espettorato. Vedere la Figura 1.



Figura 1. Apertura del contenitore di raccolta dell'espettorato

2. Versare circa 2 volte il volume del reagente del campione nell'espettorato (diluizione RC:espettorato = 2:1). Vedere la Figura 17 e la Figura 18.



Figura 2. Esempio di diluizioni 2:1 (8 ml di SR:4 ml di espettorato)



Figura 3. Esempio di diluizione 2:1 (2 ml di SR:1 ml di espettorato)

Nota Gettare l'RC residuo e il flacone nell'apposito contenitore dei rifiuti seguendo le procedure standard del proprio istituto.

3. Fissare il coperchio sul contenitore del campione.
4. Scuotere vigorosamente per 10-20 volte o agitare in vortex per almeno 10 secondi.

Nota Un singolo scuotimento è rappresentato da un movimento in avanti e indietro.

5. Lasciare il campione in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente, quindi scuoterlo vigorosamente per 10-20 volte oppure agitarlo in vortex per almeno 10 secondi.
6. Lasciare il campione in incubazione a temperatura ambiente per altri 5 minuti.

12.2 Procedura per sedimenti di espettorato decontaminato, concentrato

Importante Iniziare il test entro 2,5 ore dall'aggiunta dell'RC al campione di analisi o entro 4 ore se conservato a 2-8 °C.

Nota Scartare i campioni di analisi contenenti evidenti particelle di cibo o altre particelle solide.

Requisiti di volume: il metodo di Kent e Kubica¹¹ (procedura di digestione-decontaminazione con impiego del metodo NALC-NaOH e risospensione in tampone fosfato 67 mM/H₂O) può essere analizzato con il test Xpert MTB/XDR. Dopo la risospensione, conservare almeno 0,5 ml di sedimento risospeso per il test Xpert MTB/XDR. Per tutti i volumi minori di 0,7 ml, seguire le istruzioni riportate ai passaggi da 1 a 5 per la preparazione dei campioni. Questi passaggi richiedono 3 parti di RC per 1 parte di sedimento, in modo da produrre un volume adeguato a ottenere prestazioni ottimali del test. Se il volume di campione è uguale a o maggiore di 0,7 ml, è possibile ottenere un volume di analisi adeguato aggiungendo 2 parti di RC a 1 parte di sedimento. In questo esempio, vengono aggiunti 1,4 ml di RC a 0,7 ml di sedimento. Questi volumi corrispondono a un rapporto di 2 parti di RC per 1 parte di sedimento.

1. Utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire 0,5 ml del pellet dal totale risospeso in una provetta conica con tappo a vite etichettata con l'ID campione e/o paziente.

Nota I sedimenti risospesi non immediatamente trattati devono essere conservati a 2-8 °C. Non conservare per più di 7 giorni.

2. Aggiungere 1,5 ml di reagente per il campione (RC) a 0,5 ml di sedimento risospeso.
3. Scuotere vigorosamente per 10-20 volte o agitare in vortex per almeno 10 secondi.

Nota Un singolo scuotimento è rappresentato da un movimento in avanti e indietro.

4. Lasciare il campione in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente, quindi scuoterlo vigorosamente per 10-20 volte oppure agitarlo in vortex per almeno 10 secondi.
5. Lasciare il campione in incubazione a temperatura ambiente per altri 5 minuti.

12.3 Preparazione della cartuccia

Importante Accertarsi che il modulo sia pronto ad accettare la cartuccia. Cominciare il test non appena possibile ed entro e non oltre 2,5 ore dall'aggiunta alla cartuccia del campione trattato con il reagente per il campione oppure entro 4 ore se conservato a 2-8 °C.

Elementi necessari: cartuccia Xpert, pipetta di trasferimento (fornita) e un campione per il test opportunamente raccolto ed etichettato.

1. Estrarre una cartuccia dalla confezione.
2. Controllare che la cartuccia non sia danneggiata. Se danneggiata, non utilizzarla.
3. Portare la cartuccia a temperatura ambiente. Etichettare ciascuna cartuccia di Xpert MTB/XDR con l'ID del campione. Vedere la Figura 4.



Figura 4. Annotazione sul lato della cartuccia.

Nota Scrivere sul lato della cartuccia o applicare un'etichetta con l'ID. Non applicare l'etichetta sul coperchio della cartuccia o sopra un codice a barre 2D presente sulla cartuccia.

4. Aprire il coperchio della cartuccia e poi il contenitore del campione.
5. Usando la pipetta di trasferimento fornita, aspirare il campione liquefatto fino alla tacca sulla pipetta. Non procedere con il trattamento del campione in presenza di un volume insufficiente. Vedere la Figura 5.



Figura 5. Aspirazione fino alla tacca sulla pipetta

6. Dispensare il campione lentamente in modo da contenere il rischio di formazione di aerosol. Vedere la Figura 6.



Figura 6. Cartuccia Xpert MTB/XDR

7. Chiudere il coperchio della cartuccia.

12.4 Avvio del test

Importante Prima di iniziare il test, verificare che il file di definizione del saggio Xpert MTB/XDR sia stato importato all'interno del software. Questa sezione elenca le fasi principali di esecuzione del test. Per istruzioni dettagliate, vedere il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx*.

Nota I passaggi da seguire possono variare se l'amministratore del sistema modifica il flusso di lavoro predefinito del sistema.

1. Accendere lo strumento GeneXpert.
 - Se si utilizza lo strumento GeneXpert Dx, accendere prima lo strumento e poi il computer. Il software GeneXpert Dx si avvia automaticamente; in caso contrario, fare doppio clic sull'icona GeneXpert Dx sul desktop di Windows®.
2. Connettersi al software del sistema di strumentazione GeneXpert usando il proprio nome utente e la password.
3. Nella finestra del sistema GeneXpert Dx, fare clic su **Crea analisi (Create Test)**. Verrà visualizzata la finestra **Crea analisi (Create Test)**.
4. Eseguire la scansione dell'ID paziente (Patient ID) o l'ID campione (Sample ID) o digitare l'ID paziente o l'ID campione. Se l'ID campione (Sample ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID campione (Sample ID) viene visualizzato sul lato sinistro della finestra **Visualizza risultati (View Results)** ed è associato ai risultati del test.
5. Eseguire la scansione del codice a barre sulla cartuccia Xpert MTB/XDR. Utilizzando le informazioni contenute nel codice a barre, il software compila automaticamente le caselle relative ai seguenti campi: **ID lotto reagente (Reagent Lot ID)**, **Cartuccia S/N (Cartridge S/N)** e **Data di scadenza (Expiration Date)**. Vedere... Figura 7.

Nota Se non si riesce a eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia Xpert MTB/XDR, ripetere il test con una cartuccia nuova.

The screenshot shows a software window titled "Crea analisi" with a close button (X) in the top right corner. The window contains the following fields and controls:

- ID paziente:** Text input field containing "John Smith".
- ID campione:** Text input field containing "CPH123-01".
- Nome:** Text input field.
- Versione:** Text input field.
- Seleziona saggio:** Dropdown menu showing "Xpert MTB/XDR IVD" and "1".
- Selezionare il modulo:** Dropdown menu showing "A1".
- ID lotto reagente:** Text input field containing "00503".
- Data di scadenza:** Text input field containing "2090/12/24".
- N/S cartuccia:** Text input field containing "0384099858".
- Tipo di analisi:** Dropdown menu showing "Campione".
- Tipo di campione:** Dropdown menu showing "Altro".
- Altro tipo di campione:** Text input field.
- Note:** Large empty text area.

At the bottom of the window, there are three buttons: "Avvia analisi", "Esegui scansione del codice a barre della cartuccia", and "Annulla".

Figura 7. Finestra Crea analisi GX Dx (GX Dx Create Test)

6. Fare clic su **Avvia analisi (Start Test)**. Digitare la password nella finestra di dialogo visualizzata.
7. Per lo strumento GeneXpert Dx:
 - a) Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
 - b) Chiudere lo sportello. Il test viene avviato e la spia verde smette di lampeggiare. Al termine del test, la spia si spegne.
 - c) Attendere che il sistema abbia sbloccato lo sportello del modulo prima di aprirlo, quindi rimuovere la cartuccia.
8. Smaltire le cartucce usate negli appositi contenitori dei rifiuti di campioni di analisi attenendosi alle prassi standard della struttura sanitaria di appartenenza.

13 Visualizzazione e stampa dei risultati

In questa sezione sono elencati i passaggi principali per la visualizzazione e la stampa dei risultati. Per istruzioni più dettagliate su come visualizzare e stampare i risultati, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*, a seconda del modello utilizzato.

1. Per visualizzare i risultati, fare clic sull'icona **Visualizza risultati (View Results)**.
2. Una volta completato il test, fare clic sul pulsante **Rapporto (Report)** nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** per visualizzare e/o generare un file di rapporto in formato PDF.

14 Controlli qualità incorporati

Ciascun test comprende un controllo per il trattamento dei campioni (Sample Processing Control, SPC) e un controllo per la verifica della sonda (Probe Check Control, PCC).

- **Controllo per il trattamento dei campioni (SPC)**— L'SPC verifica che il trattamento dei campioni sia adeguato. Questo controllo rileva inoltre l'inibizione del saggio di PCR in tempo reale associata al campione, garantisce che le condizioni di reazione della PCR (temperatura e tempo) siano adeguate alla reazione di amplificazione e che i reagenti PCR siano funzionali. L'SPC deve essere positivo in un campione negativo e può essere negativo o positivo in un campione positivo. L'SPC si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.
- **Controllo per la verifica della sonda (PCC)** – Prima che inizi la reazione PCR, il sistema GeneXpert misura il segnale di fluorescenza emesso dalle sonde, allo scopo di monitorare la reidratazione delle microsferi, il riempimento delle

provette di reazione, l'integrità delle sonde e la stabilità dei coloranti. Il PCC si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.

- **Controllo di adeguatezza del volume del campione (SVA)**—Prima del trattamento del campione, il sistema GeneXpert misura se nella camera del campione è presente un volume adeguato di campione di analisi. Se il controllo SVA non dà esito positivo, significa che non è stato aggiunto il volume adeguato di campione richiesto per l'analisi alla camera del campione.

Controlli esterni—I controlli esterni possono essere usati in conformità con le prescrizioni degli organismi di accreditamento locali, regionali e nazionali pertinenti.

15 Interpretazione dei risultati

Il GeneXpert Instrument Systems genera i risultati da una combinazione di segnali fluorescenti misurati e valori di melt temperature (T_m). Le mutazioni e le sequenze wild type sono rilevate dal sistema GeneXpert sulla base dei valori di T_m . La determinazione della sensibilità o della resistenza dipende dal punto in cui rientrano i valori di T_m all'interno rispettivamente della finestra wild type o mutanti per un determinato analita. I risultati positivi per il test Xpert MTB/XDR possono essere **MTB RILEVATA (MTB DETECTED)** e tutti i bersagli di resistenza sono **NON RILEVATA (NOT DETECTED)** o **MTB RILEVATA (MTB DETECTED)** e uno o più bersagli di resistenza è **RILEVATA (DETECTED)** o **MTB RILEVATA (MTB DETECTED)** e/o uno o più dei seguenti bersagli di resistenza è **INCERTA (INDETERMINATE)**. Vedere Tabella 2 per un elenco dei possibili risultati per ogni singolo bersaglio.

Tabella 2. Possibili risultati del test per ogni bersaglio nel test Xpert MTB/XDR

Classe di farmaco	Risultato
N/A	NON VALIDO (INVALID)/ERRORE (ERROR)/NESSUN RISULTATO (NO RESULT)
	MTB RILEVATA (MTB DETECTED)
	MTB NON RILEVATA (MTB NOT DETECTED)
Isoniazide	RILEVATA bassa resistenza a INH (Low INH Resistance DETECTED)
	RILEVATA resistenza a INH (INH Resistance DETECTED)
	NON RILEVATA resistenza a INH (INH Resistance NOT DETECTED)
	Resistenza a INH INCERTA (INH Resistance INDETERMINATE)
Fluorochinolone	RILEVATA bassa resistenza a FLQ (Low FLQ Resistance DETECTED)
	RILEVATA resistenza a FLQ (FLQ Resistance DETECTED)
	NON RILEVATA resistenza a FLQ (FLQ Resistance NOT DETECTED)
	Resistenza a FLQ INCERTA (FLQ Resistance INDETERMINATE)
Amicacina	RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance DETECTED)
	NON RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance NOT DETECTED)
	Resistenza a AMK INCERTA (AMK Resistance INDETERMINATE)
Canamicina	RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance DETECTED)
	NON RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance NOT DETECTED)
	Resistenza a KAN INCERTA (KAN Resistance INDETERMINATE)
Capreomicina	RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance DETECTED)
	NON RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance NOT DETECTED)
	Resistenza a CAP INCERTA (CAP Resistance INDETERMINATE)

Classe di farmaco	Risultato
Etionamide ^a	RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance DETECTED)
	NON RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance NOT DETECTED)

^a Il design dello studio non prevede che venga fornito un risultato Resistenza a ETH INCERTA (ETH Resistance INDETERMINATE).

Tabella 3 riassume i geni bersaglio del test Xpert MTB/XDR nonché la regione dei codoni e i nucleotidi coperti per ciascuno dei geni interrogati per l'identificazione o la desunzione di farmacoresistenza.

Tabella 3. Regioni interrogate determinanti farmacoresistenza

Farmaco	Gene bersaglio	Regioni dei codoni	Nucleotide
Isoniazide	promotore <i>inhA</i>	NA	da -1 a -32 intergenico
	<i>katG</i>	311–319	939–957
	<i>fabG1</i>	199–210	597–630
	regione intergenica <i>oxyR-ahpC</i>	NA	da -5 to -50 intergenico (o da -47 a -92) ^{12,13}
Etionamide	promotore <i>inhA</i>	NA	da -1 a -32 intergenico
Fluoroquinoloni	<i>gyrA</i>	87–95	261–285
	<i>gyrB</i>	531–544 (o 492–505) ^{12,14}	1596–1632
Amicacina, canamicina, capreomicina	<i>rrs</i>	NA	1396–1417
	promotore <i>eis</i>	NA	da -6 a -42 intergenico

Vedere Tabella 4 per esempi di possibili risultati e la rispettiva interpretazione. Da Figura 8 a Figura 16 sono riportati esempi di possibili risultati del test Xpert MTB/XDR.

Tabella 4. Esempi di risultati e interpretazione del test Xpert MTB/XDR

Risultato	Interpretazione
MTB RILEVATA (MTB DETECTED); NON RILEVATA resistenza a INH (INH Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a FLQ (FLQ Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance NOT DETECTED)	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Non sono rilevate mutazioni determinanti resistenza a INH, FLQ, AMK, KAN, CAP o ETH. • SPC: NA (non applicabile). Non è necessario un segnale SPC perché l'amplificazione MTB può competere con questo controllo. • Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.
MTB RILEVATA (MTB DETECTED); RILEVATA resistenza a INH (INH Resistance DETECTED) RILEVATA resistenza a FLQ (FLQ Resistance DETECTED) RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance DETECTED) RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance DETECTED) RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance DETECTED) RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance DETECTED)	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a INH sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: regione intergenica <i>katG</i>, <i>fabG1</i>, <i>oxyR-ahpC</i> e promotore di <i>inhA</i> • Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a FLQ sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: regioni <i>gyrA</i> e <i>gyrB</i> determinanti resistenza ai chinoloni (QRDR) • Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a AMK sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: gene <i>rrs</i> e promotore di <i>eis</i> • Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a KAN sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: gene <i>rrs</i> e promotore di <i>eis</i> • Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a CAP sono state rilevate nel seguente gene: gene <i>rrs</i> • Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a ETH sono state rilevate nel seguente gene: promotore di <i>inhA</i> • SPC: NA (non applicabile). Non è necessario un segnale SPC perché l'amplificazione MTB può competere con questo controllo. • Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.
MTB RILEVATA (MTB DETECTED); RILEVATA resistenza a INH (INH Resistance DETECTED) NON RILEVATA resistenza a FLQ (FLQ Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance NOT DETECTED)	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Non sono state rilevate mutazioni determinanti resistenza a FLQ, AMK, KAN, CAP e ETH. • Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a INH sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: regione intergenica <i>katG</i>, <i>fabG1</i> e <i>oxyR-ahpC</i> • SPC: NA (non applicabile). Non è necessario un segnale SPC perché l'amplificazione MTB può competere con questo controllo. • Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.

Risultato	Interpretazione
<p>MTB RILEVATA (MTB DETECTED); RILEVATA resistenza a INH (INH Resistance DETECTED) Resistenza a FLQ INCERTA (FLQ Resistance INDETERMINATE) NON RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance NOT DETECTED)</p>	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Non sono state rilevate mutazioni determinanti resistenza a AMK, KAN, CAP e ETH. ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a INH sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: regione intergenica <i>katG</i>, <i>fabG1</i> e <i>oxyR-ahpC</i> ● Non è stato possibile determinare la presenza di mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza ai FLQ a causa del rilevamento di sola WT Tm da una o più sonde e nessuna Tm da una o più sonde mirate a uno o più dei seguenti geni: <i>gyrA</i> o <i>gyrB</i>. “OPPURE” nessuna Tm da alcuna delle sonde mirate ai geni <i>gyrA</i> e <i>gyrB</i>. ● SPC: NA (non applicabile). Non è necessario un segnale SPC perché l'amplificazione MTB può competere con questo controllo. ● Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.
<p>MTB RILEVATA (MTB DETECTED); RILEVATA bassa resistenza a INH (Low INH Resistance DETECTED) NON RILEVATA resistenza a FLQ (FLQ Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance NOT DETECTED) RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance DETECTED)</p>	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Non sono state rilevate mutazioni determinanti resistenza a FLQ, AMK, KAN e CAP. ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di una bassa resistenza a INH sono state rilevate nella regione del promotore di <i>inhA</i> ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a ETH sono state rilevate nella regione del promotore di <i>inhA</i> ● SPC: NA (non applicabile). Non è necessario un segnale SPC perché l'amplificazione MTB può competere con questo controllo. ● Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.
<p>MTB RILEVATA (MTB DETECTED); NON RILEVATA resistenza a INH (INH Resistance NOT DETECTED) RILEVATA bassa resistenza a FLQ (Low FLQ Resistance DETECTED) NON RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance NOT DETECTED)</p>	<p>Il bersaglio MTB è presente all'interno del campione; rilevata resistenza di basso grado ai FLQ.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Non sono state rilevate mutazioni determinanti resistenza a INH, AMK, KAN, CAP e ETH. ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di bassa resistenza a FLQ sono state rilevate nei seguenti geni: <i>gyrA</i> ● SPC: NA (non applicabile). Non è necessario un segnale SPC perché l'amplificazione MTB può competere con questo controllo. ● Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.

Risultato	Interpretazione
MTB RILEVATA (MTB DETECTED); RILEVATA resistenza a INH (INH Resistance DETECTED) NON RILEVATA resistenza a FLQ (FLQ Resistance NOT DETECTED) RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance DETECTED) RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance DETECTED) RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance DETECTED) NON RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance NOT DETECTED)	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Non sono state rilevate mutazioni determinanti resistenza a FLQ e ETH. ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a INH sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: <i>katG</i>, <i>fabG1</i>, <i>oxyR-ahpC</i> ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a AMK sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: gene <i>rrs</i>; promotore di <i>eis</i> ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a KAN sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: gene <i>rrs</i>; promotore di <i>eis</i> ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a CAP sono state rilevate nel seguente gene: gene <i>rrs</i> ● SPC: NA (non applicabile). Non è necessario un segnale SPC perché l'amplificazione MTB può competere con questo controllo. ● Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.
MTB RILEVATA (MTB DETECTED); RILEVATA resistenza a INH (INH Resistance DETECTED) RILEVATA bassa resistenza a FLQ (Low FLQ Resistance DETECTED) NON RILEVATA resistenza a AMK (AMK Resistance NOT DETECTED) RILEVATA resistenza a KAN (KAN Resistance DETECTED) NON RILEVATA resistenza a CAP (CAP Resistance NOT DETECTED) NON RILEVATA resistenza a ETH (ETH Resistance NOT DETECTED)	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Non sono state rilevate mutazioni determinanti resistenza a AMK, CAP e ETH. ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a INH sono state rilevate in uno o più dei seguenti geni: regione intergenica <i>katG</i>, <i>fabG1</i>, <i>oxyR-ahpC</i> e promotore di <i>inhA</i> ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di bassa resistenza a FLQ sono state rilevate nel seguente gene: <i>gyrA</i> ● Mutazioni che contribuiscono allo sviluppo di resistenza a KAN sono state rilevate nella regione del promotore <i>eis</i> ● SPC: NA (non applicabile). Non è necessario un segnale SPC perché l'amplificazione MTB può competere con questo controllo. ● Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.
MTB NON RILEVATA (MTB NOT DETECTED)	<p>Il bersaglio MTB non è stato rilevato nel campione:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● SPC: AMMESSO (PASS). L'SPC soddisfa i criteri di accettazione. ● Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.
NON VALIDO (INVALID)	<p>Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di MTB. L'SPC non soddisfa i criteri di accettazione, il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita. Ripetere l'analisi. Vedere la sezione Sezione 16.2. Procedura di ripetizione del test di questo documento.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● MTB: NON VALIDO (INVALID). Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di DNA di MTB. ● SPC: RESPINTO (FAIL). Il risultato del bersaglio per MTB è negativo e il ciclo soglia (Ct) per SPC non rientra nel range di validità. ● Verifica della sonda: AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono riusciti.

Risultato	Interpretazione
ERRORE (ERROR)	<p>Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di MTB. Ripetere l'analisi. Vedere la sezione Sezione 16.2. Procedura di ripetizione del test di questo documento.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● MTB: NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● SPC: NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● Verifica della sonda: RESPINTO (FAIL). Uno o tutti i risultati di verifica della sonda non sono validi. <hr/> <p>Nota se la verifica della sonda ha avuto esito positivo, l'errore potrebbe essere dovuto a un guasto di un componente del sistema, a un errore dell'operatore o a un problema di integrità della cartuccia.</p>
NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	<p>Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di MTB. Ripetere l'analisi. Vedere la sezione Sezione 16.2. Procedura di ripetizione del test di questo documento. NESSUN RISULTATO (NO RESULT) indica che i dati raccolti sono insufficienti. Ad esempio, l'operatore ha interrotto un test in corso.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● MTB: NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● SPC: NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● Verifica della sonda: NA (non applicabile)

Nota I dati riportati di seguito forniscono risultati rappresentativi, inclusa la scheda Picco di fusione (Melt Peak), prevedibili con il test Xpert MTB/XDR nella vista utente dettagliata di GeneXpert Dx. Non sono riportate tutte le combinazioni di risultati possibili.

Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
Nome saggio		MTB-XDR		Versione 3		
Risultato		MTB RILEVATO; INH Resistance NON RILEVATO; FLQ Resistance NON RILEVATO; AMK Resistance NON RILEVATO; KAN Resistance NON RILEVATO; CAP Resistance NON RILEVATO; ETH Resistance NON RILEVATO				
Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
	Nome analita		Temperatura picco di fusione			Altezza picco fusione
	inhA-melt		76,3			292,5
	katG-melt		73,8			107,0
	fabG1-melt		71,5			242,0
	ahpC-melt		68,7			41,3
	gyrA1-melt		76,2			73,9
	gyrA2-melt		70,4			75,8
	gyrA3-melt		71,0			129,8
	gyrB2-melt		69,5			77,8
	rrs-melt		75,0			188,7
	eis-melt		68,5			145,3
	inhA-mut melt					
	katG-mut melt					
	fabG1-mut melt					
	ahpC-mut melt					
	gyrA1-mutA melt					
	gyrA1-mutB melt					
	gyrA1-mutC melt					
	gyrA2-mutA melt					
	gyrA2-mutB melt					
	gyrA3-mutA melt					
	gyrA3-mutB melt					
	gyrA3-mutC melt					
	gyrB2-mut melt					
	rrs-mut melt					
	eis-mutA melt					
	eis-mutB melt					

Figura 8. MTB RILEVATA; resistenza a INH, FLQ, AMK, KAN, CAP e ETH NON RILEVATA

Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
Nome saggio MTB-XDR Versione 3						
Risultato	MTB RILEVATO; INH Resistance RILEVATO; FLQ Resistance RILEVATO; AMK Resistance RILEVATO; KAN Resistance RILEVATO; CAP Resistance RILEVATO; ETH Resistance RILEVATO					
Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
	Nome analita		Temperatura picco di fusione			Altezza picco fusione
	inhA-melt					
	katG-melt					
	fabG1-melt					
	ahpC-melt					
	gyrA1-melt			76,1		90,0
	gyrA2-melt			69,6		39,7
	gyrA3-melt					
	gyrB2-melt					
	rrs-melt					
	eis-melt					
	inhA-mut melt			70,9		259,6
	katG-mut melt			68,4		214,0
	fabG1-mut melt			75,9		181,1
	ahpC-mut melt			66,2		68,2
	gyrA1-mutA melt					
	gyrA1-mutB melt					
	gyrA1-mutC melt					
	gyrA2-mutA melt					
	gyrA2-mutB melt					
	gyrA3-mutA melt					
	gyrA3-mutB melt			76,0		125,0
	gyrA3-mutC melt					
	gyrB2-mut melt			66,0		103,2
	rrs-mut melt			71,0		125,7
	eis-mutA melt			71,4		163,9
	eis-mutB melt					

Figura 9. MTB RILEVATA; resistenza a INH, FLQ, AMK, KAN, CAP e ETH RILEVATA

Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
Nome saggio	MTB-XDR		Versione 3			
Risultato	MTB RILEVATO; INH Resistance RILEVATO; FLQ Resistance NON RILEVATO; AMK Resistance NON RILEVATO; KAN Resistance NON RILEVATO; CAP Resistance NON RILEVATO; ETH Resistance NON RILEVATO					
Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
	Nome analita		Temperatura picco di fusione			Altezza picco fusione
	inhA-melt		76,6			284,9
	katG-melt		74,0			105,2
	fabG1-melt					
	ahpC-melt		69,0			35,4
	gyrA1-melt		76,6			65,2
	gyrA2-melt		70,4			64,9
	gyrA3-melt		71,4			92,2
	gyrB2-melt		69,7			84,7
	rrs-melt		75,3			146,8
	eis-melt		68,7			124,2
	inhA-mut melt					
	katG-mut melt					
	fabG1-mut melt		75,9			178,0
	ahpC-mut melt					
	gyrA1-mutA melt					
	gyrA1-mutB melt					
	gyrA1-mutC melt					
	gyrA2-mutA melt					
	gyrA2-mutB melt					
	gyrA3-mutA melt					
	gyrA3-mutB melt					
	gyrA3-mutC melt					
	gyrB2-mut melt					
	rrs-mut melt					
	eis-mutA melt					
	eis-mutB melt					

Figura 10. MTB RILEVATA, resistenza a INH RILEVATA

Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
Nome saggio MTB-XDR Versione 4						
Risultato MTB RILEVATO; INH Resistance RILEVATO; FLO Resistance NON RILEVATO; AMK Resistance INCERTO; KAN Resistance RILEVATO; CAP Resistance INCERTO; ETH Resistance RILEVATO						
Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
	Nome analita		Temperatura picco di fusione			Altezza picco fusione
	inhA-melt					
	katG-melt					
	fabG1-melt			71,5		254,6
	ahpC-melt			68,7		49,4
	gyrA1-melt			76,3		62,9
	gyrA2-melt			70,2		59,8
	gyrA3-melt			71,5		56,5
	gyrB2-melt			69,4		74,8
	rrs-melt					
	eis-melt					
	inhA-mut melt			70,9		277,7
	katG-mut melt			68,2		157,7
	fabG1-mut melt					
	ahpC-mut melt					
	gyrA1-mutA melt					
	gyrA1-mutB melt					
	gyrA1-mutC melt					
	gyrA2-mutA melt					
	gyrA2-mutB melt					
	gyrA3-mutA melt					
	gyrA3-mutB melt					
	gyrA3-mutC melt					
	gyrB2-mut melt					
	rrs-mut melt					
	eis-mutA melt					
	eis-mutB melt			62,6		46,5

Figura 11. MTB RILEVATA; resistenza a INH e KAN RILEVATA; AMK e CAP INDETERMINATA

Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
Nome saggio MTB-XDR Versione 3						
Risultato MTB RILEVATO; INH Resistance RILEVATO; Low FLO Resistance RILEVATO; AMK Resistance NON RILEVATO; KAN Resistance NON RILEVATO; CAP Resistance NON RILEVATO; ETH Resistance NON RILEVATO						
Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
	Nome analita		Temperatura picco di fusione			Altezza picco fusione
	inhA-melt		76,5			313,1
	katG-melt					
	fabG1-melt		71,7			211,5
	ahpC-melt		69,0			47,2
	gyrA1-melt					
	gyrA2-melt					
	gyrA3-melt					
	gyrB2-melt		69,6			81,1
	rrs-melt		75,2			248,1
	eis-melt		68,8			158,2
	inhA-mut melt					
	katG-mut melt		68,4			184,6
	fabG1-mut melt					
	ahpC-mut melt					
	gyrA1-mutA melt					
	gyrA1-mutB melt		72,3			125,0
	gyrA1-mutC melt					
	gyrA2-mutA melt		76,0			207,9
	gyrA2-mutB melt					
	gyrA3-mutA melt					
	gyrA3-mutB melt		76,5			128,0
	gyrA3-mutC melt					
	gyrB2-mut melt					
	rrs-mut melt					
	eis-mutA melt					
	eis-mutB melt					

Figura 12. MTB RILEVATA; resistenza a INH e bassa resistenza a FLQ RILEVATA

Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
Nome saggio MTB-XDR Versione 3						
Risultato	<div style="background-color: red; color: white; padding: 5px;"> MTB RILEVATO; INH Resistance RILEVATO; FLQ Resistance RILEVATO; AMK Resistance RILEVATO; KAN Resistance RILEVATO; </div> <div style="background-color: green; color: black; padding: 5px;"> CAP Resistance NON RILEVATO; ETH Resistance NON RILEVATO </div>					
Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
	Nome analita		Temperatura picco di fusione			Altezza picco fusione
	inhA-melt		76,6			278,9
	katG-melt					
	fabG1-melt		71,7			226,6
	ahpC-melt		69,0			42,9
	gyrA1-melt					
	gyrA2-melt					
	gyrA3-melt					
	gyrB2-melt		69,8			68,7
	rrs-melt		75,3			198,7
	eis-melt					
	inhA-mut melt					
	katG-mut melt		68,5			204,1
	fabG1-mut melt					
	ahpC-mut melt					
	gyrA1-mutA melt					
	gyrA1-mutB melt		72,9			88,0
	gyrA1-mutC melt					
	gyrA2-mutA melt					
	gyrA2-mutB melt					
	gyrA3-mutA melt					
	gyrA3-mutB melt					
	gyrA3-mutC melt		69,1			113,4
	gyrB2-mut melt					
	rrs-mut melt					
	eis-mutA melt		71,6			183,4
	eis-mutB melt					

Figura 13. MTB RILEVATA; resistenza a INH, FLQ, AMK e KAN RILEVATA

Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
Nome saggio		MTB-XDR		Versione 3		
Risultato		MTB NON RILEVATO				
Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
	Nome analita		Temperatura picco di fusione			Altezza picco fusione
	inhA-melt					
	katG-melt					
	fabG1-melt					
	ahpC-melt					
	gyrA1-melt					
	gyrA2-melt					
	gyrA3-melt					
	gyrB2-melt					
	rrs-melt					
	eis-melt					
	inhA-mut melt					
	katG-mut melt					
	fabG1-mut melt					
	ahpC-mut melt					
	gyrA1-mutA melt					
	gyrA1-mutB melt					
	gyrA1-mutC melt					
	gyrA2-mutA melt					
	gyrA2-mutB melt					
	gyrA3-mutA melt					
	gyrA3-mutB melt					
	gyrA3-mutC melt					
	gyrB2-mut melt					
	rrs-mut melt					
	eis-mutA melt					
	eis-mutB melt					

Figura 14. MTB NON RILEVATA (MTB NOT DETECTED)

Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
Nome saggio		MTB-XDR		Versione 3		
Risultato		NON VALIDO				
Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
	Nome analita		Temperatura picco di fusione			Altezza picco fusione
	inhA-melt		76,8			102,1
	katG-melt					
	fabG1-melt		71,7			53,1
	ahpC-melt		69,1			34,9
	gyrA1-melt		76,6			71,4
	gyrA2-melt					
	gyrA3-melt		71,5			40,7
	gyrB2-melt		70,2			38,9
	rrs-melt					
	eis-melt		68,6			109,4
	inhA-mut melt					
	katG-mut melt		68,5			49,4
	fabG1-mut melt					
	ahpC-mut melt					
	gyrA1-mutA melt					
	gyrA1-mutB melt					
	gyrA1-mutC melt					
	gyrA2-mutA melt					
	gyrA2-mutB melt					
	gyrA3-mutA melt					
	gyrA3-mutB melt					
	gyrA3-mutC melt					
	gyrB2-mut melt					
	rrs-mut melt					
	eis-mutA melt					
	eis-mutB melt					

Figura 15. NON VALIDO (INVALID)

Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
Nome saggio		MTB-XDR		Versione 3		
Risultato		ERRORE				
Risultato	Risultato analita	Dettaglio	Picchi di fusione	Errori	Cronologia	Assistenza
	Nome analita		Temperatura picco di fusione			Altezza picco fusione
inhA-melt						
katG-melt						
fabG1-melt						
ahpC-melt						
gyrA1-melt						
gyrA2-melt						
gyrA3-melt						
gyrB2-melt						
rrs-melt						
eis-melt						
inhA-mut melt						
katG-mut melt						
fabG1-mut melt						
ahpC-mut melt						
gyrA1-mutA melt						
gyrA1-mutB melt						
gyrA1-mutC melt						
gyrA2-mutA melt						
gyrA2-mutB melt						
gyrA3-mutA melt						
gyrA3-mutB melt						
gyrA3-mutC melt						
gyrB2-mut melt						
rrs-mut melt						
eis-mutA melt						
eis-mutB melt						

Figura 16. ERRORE (ERROR)

16 Ripetizioni del test

16.1 Motivi per ripetere il test

Se si ottiene uno dei risultati riportati qui di seguito, ripetere il test attenendosi alle istruzioni riportate nella Sezione 16.2. Procedura di ripetizione del test.

- Un risultato **NON VALIDO (INVALID)** indica che l'SPC non è stato superato. Il campione non è stato trattato correttamente oppure la PCR è stata inibita oppure il campione non è stato raccolto correttamente.
- Un risultato **ERRORE (ERROR)** potrebbe essere causato, in via esemplificativa ma non esaustiva, da un controllo per la verifica della sonda respinto o dal superamento dei limiti massimi di pressione.
- **NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** indica che i dati raccolti sono insufficienti. Ad esempio, l'operatore ha interrotto un test che era in esecuzione oppure si è verificata un'interruzione di alimentazione.
- Un risultato **INCERTO (INDETERMINATE)** indica che non è stato possibile concludere in via definitiva la resistenza a un determinato farmaco in base all'algoritmo del saggio (per ulteriori spiegazioni, vedere Sezione 17. Limitazioni). La ripetizione del test con un campione diverso potrebbe o meno generare un risultato diverso.

16.2 Procedura di ripetizione del test

Per ripetere il test, adoperare una nuova cartuccia (non riutilizzare la cartuccia usata). Se si dispone di un avanzo di espettorato residuo (deve essere $\geq 1,0$ ml) o di sedimento ricostituito (deve essere $\geq 0,5$ ml), usare sempre reagente del campione nuovo per decontaminare e liquefare l'espettorato prima di eseguire il test. Seguire le istruzioni per il trattamento del campione secondo Sezione 12.1. Procedura per espettorato non trattato o Sezione 12.2. Procedura per sedimenti di espettorato decontaminato, concentrato.

Se è disponibile un campione residuo trattato con RC in sufficiente quantità e stato conservato per non più di 2,5 ore a una temperatura massima di 35 °C o conservato per non più di 4 ore a 2-8 °C dall'aggiunta iniziale del RC al campione, il campione residuo trattato con RC può essere trattato utilizzando una nuova cartuccia. Quando si ripete il test, utilizzare sempre una nuova cartuccia e iniziare il test entro 30 minuti dall'aggiunta del campione trattato alla cartuccia. Vedere la Sezione 12.3. Preparazione della cartuccia.

17 Limitazioni

- Le prestazioni del test Xpert MTB/XDR sono state convalidate tramite le procedure fornite nel presente foglietto illustrativo. Le modifiche apportate alla procedura del test XDR devono essere interpretate insieme ad altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.
- Le prestazioni del test Xpert MTB/XDR dipendono dalla competenza dell'operatore e dall'adesione alle procedure del saggio. Errori nella procedura del test possono generare risultati falsi positivi o falsi negativi. Tutti gli operatori del dispositivo devono avere acquisito una formazione adeguata sul dispositivo e sul test.
- I risultati del test devono essere interpretati da un operatore sanitario addestrato nel quadro complessivo dell'anamnesi, dei segni e sintomi clinici del paziente e dei risultati di altri test diagnostici.
- Il rilevamento del DNA del complesso MTB dipende dal numero di organismi presenti nel campione, pertanto l'affidabilità dei risultati del test dipende dalla correttezza della raccolta, manipolazione e conservazione del campione di analisi. Risultati errati dell'analisi potrebbero verificarsi a causa di errori di raccolta del campione, mancata osservanza della procedura di raccolta del campione consigliata, manipolazione o conservazione errata, errori tecnici, scambio di campioni o materiale di partenza insufficiente. Per evitare risultati errati, è necessario attenersi scrupolosamente alle istruzioni descritte in questo foglietto illustrativo.
- I risultati del test possono essere influenzati da terapie antibiotiche pregresse o in atto. Perciò, con questa analisi non è possibile valutare l'esito di una terapia, poiché il DNA potrebbe persistere anche dopo la terapia antitubercolare.
- Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di microrganismi vitali, ma presume la presenza di DNA del complesso MTB, incluse mutazioni associate a resistenza a INH, FLQ, AMK, KAN, CAP e ETH.
- Eventuali mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o delle sonde potrebbero influire sul rilevamento di ceppi di MTB multiresistenti (MDR) nuovi o non noti, con un conseguente falso risultato di farmaco sensibilità.
- Il test Xpert MTB/XDR non fornisce una conferma di sensibilità a INH, FLQ, AMK, KAN, CAP e ETH, poiché potrebbero sussistere meccanismi di resistenza diversi da quelli rilevati dal test, potenzialmente associati a una mancata di risposta clinica al trattamento.
- L'esame del sangue, del liquido cefalorachidiano (LCR), di aspirato gastrico, delle feci, istologico, delle urine non è stato valutato per l'uso nel test Xpert MTB/XDR.
- Anche se nella valutazione delle prestazioni cliniche del test Xpert MTB/XDR non sono stati inclusi campioni di espettorato indotto, l'utilizzo di soluzioni isotoniche o ipertoniche, broncodilatatori e broncodilatatori inalatori comunemente usati nel prelievo di espettorato indotto è stato valutato e non interferisce con il test. L'induzione di soluzione fisiologica potrebbe generare un numero insufficiente di microrganismi recuperati e potrebbe influire sul rilevamento di *M. tuberculosis*.
- I campioni di espettorato sedimentato concentrato usati per la valutazione delle prestazioni del test Xpert MTB/XDR sono stati preparati secondo il metodo NALC-NaOH descritto in Kent and Kubica¹¹. L'utilizzo di metodi di preparazione del sedimento diversi potrebbe alterare le prestazioni del test.
- Un test negativo non esclude la possibilità di isolare il DNA del complesso MTB dal campione di espettorato. Il test Xpert MTB/XDR deve essere usato in combinazione con la coltura micobatterica per sopperire al rischio di risultati falsi negativi e per recuperare il microrganismo ai fini di un'ulteriore caratterizzazione e dei test di sensibilità.
- I campioni di analisi con risultati **RILEVATA traccia di MTB (MTB Trace DETECTED)** quando analizzati con il test Xpert MTB/RIF Ultra sono previsti al di sotto del limite di rilevamento del test MTB/XDR e sono sconsigliati per l'analisi con il test Xpert MTB/XDR.
- Il test Xpert MTB/XDR non differenzia, per il modo in cui è strutturato, tra le specie del complesso MTB (ovvero *MTB*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedi*, *M. mungi* e *M. orygis*). Inoltre è necessario eseguire anche la coltura per stabilire l'eventuale presenza di un ceppo NTM oltre al complesso MTB.

- Una minore sensibilità è stata riportata in letteratura in pazienti pediatrici a causa della natura diffusa dell'infezione da MTB nei polmoni di questo gruppo di pazienti e delle difficoltà incontrate nell'acquisizione di campioni di analisi adeguati^{16,17}.
- Infezioni miste da MTB e *M. marinum* possono generare risultati **INCERTI (INDETERMINATE)** per FLQ a >10⁴ di *M. marinum* in presenza di ≤ 408 CFU/ml di MTB.
- In rari casi, i primer *rrs* e le sonde possono determinare una reazione crociata con i microbi ambientali o la microflora dell'espettorato, che potrebbe generare risultati **INCERTI (INDETERMINATE)** per AMK, KAN e CAP.
- Il test Xpert MTB/XDR determina la resistenza a ETH solo associata alle mutazioni nella regione del promotore di *inhA*. L'assenza di mutazioni nella regione del promotore *inhA* non esclude la resistenza a ETH. La presenza di mutazioni che conferiscono resistenza a ETH è stata segnalata nelle regioni genomiche che non sono bersaglio del test Xpert MTB/XDR.¹⁵
- L'associazione di mutazioni nei geni *oxyR-ahpC* e *gyrB* con resistenza rispettivamente a INH e FLQ non è ancora stata definita in via conclusiva, ma studi pubblicati hanno riportato la presenza di queste mutazioni in ceppi resistenti a INH e FLQ.^{18,19}
- La presenza di delezioni o rare mutazioni in uno qualsiasi dei geni target potrebbe determinare risultati **INCERTI (INDETERMINATI)** per un determinato farmaco.
- Nel caso di campioni con una popolazione mista di ceppi sia sensibili sia resistenti esiste la probabilità che il test Xpert MTB/XDR non rilevi la mutazione, se la popolazione resistente è presente a livelli non rilevabili per il test.
- Nei campioni con carica batterica molto bassa o presenza mista di ceppi sensibili e resistenti, il test Xpert MTB/XDR potrebbe non distinguere in misura affidabile fra resistenza a FLQ di grado basso e alto.

18 Prestazioni cliniche

Sono stati condotti due studi clinici. Le prestazioni cliniche del test Xpert MTB/XDR sono state stimate con campioni di analisi di espettorato non trattato archiviato congelato raccolto in modo retrospettivo e di espettorato sedimentato concentrato nell'ambito dello Studio clinico 1, e con campioni di analisi di espettorato prospettici e coltura MGIT nell'ambito dello Studio clinico 2.

18.1 Campioni di analisi di espettorato

È stato condotto uno studio clinico in cieco per valutare le prestazioni del test Xpert MTB/XDR relativamente ai metodi di riferimento microbiologici e molecolari, ovvero il test di farmaco sensibilità fenotipica (pDST) e il sequenziamento rispettivamente per il rilevamento della farmacoresistenza a INH, ETH, FLQ e SLID (AMK, KAN e CAP). Inoltre, le prestazioni cliniche del test Xpert MTB/XDR sono state confrontate con il saggio Xpert MTB/RIF o il Xpert MTB/RIF Ultra per il rilevamento di MTB. Due siti con nota prevalenza elevata per TB multifarmaco-resistente (MDR) ed ampiamente resistente ai farmaci (XDR) hanno fornito campioni di espettorato non trattato conservato congelato o campioni di espettorato sedimentato concentrato noti per essere positivi o negativi con coltura MTB

La Tabella 5 mostra la sensibilità e la specificità del test Xpert MTB/XDR relativo alla pDST per la farmacoresistenza. La sensibilità è stata >90% per INH, FLQ e AMK, >85% per KAN e CAP, e >64% per ETH; la specificità è stata >98% per tutti i farmaci.

Tabella 5. Xpert MTB/XDR vs pDST per la farmacoresistenza (campioni retrospettivi)

Farmaci	N	TP	FN	TN	FP	Sensibilità (%)	95%IC al	Specificità (%)	IC al 95%
INH	478	244	23	209	2	91,4	87,4 – 94,2	99,1	96,6 – 99,7
FLQ	417	148	11	254	4	93,1	88,0 - 96,1	98,5	96,1 – 99,4
AMK	405	79	7	317	2	91,9	84,1 – 96,0	99,4	97,7 – 99,8
KAN	343	58	8	276	1	87,9	77,9 – 93,7	99,6	98,0 – 99,9
CAP	167	21	4	142	0	84,0	65,3 – 93,6	100,0	97,4 – 100,0
ETH	230	75	41	112	2	64,7 ^a	55,6 – 72,8	98,3	93,8 – 99,5

^a La segnalazione della resistenza all'ETH si basa solo sul rilevamento di mutazioni del promotore di *inhA*, con conseguente minore sensibilità.

La Tabella 6 mostra la sensibilità e la specificità del test Xpert MTB/XDR relativo al sequenziamento per la farmacoresistenza. La sensibilità è stata >93% per FLQ e maggiore del 96% per INH, AMK, KAN, CAP ed ETH; la specificità è stata del 100,0% per tutti i farmaci elencati nella tabella ad eccezione di INH per il quale è stata del 98,7%.

Tabella 6. Xpert MTB/XDR vs. Sequenziamento per la farmacoresistenza (campioni retrospettivi)

Farmaci	N	TP	FN	TN	FP	Sensibilità (%)	95%IC al	Specificità (%)	IC al 95%
INH	471	241	3	224	3	98,8	96,5 - 99,6	98,7	96,2 - 99,5
FLQ	469	152	11	306	0	93,3	88,3 - 96,2	100,0	98,8 - 100,0
AMK	463	81	3	379	0	96,4	90,0 - 98,8	100,0	99,0 - 100,0
KAN	463	88	3	372	0	96,7	90,8 - 98,9	100,0	99,0 - 100,0
CAP	463	78	3	382	0	96,3	89,7 - 98,7	100,0	99,0 - 100,0
ETH	473	104	3	366	0	97,2	92,1 - 99,0	100,0	99,0 - 100,0

La Tabella 7 mostra che la percentuale di concordanza positiva (PPA) e la percentuale di concordanza negativa (NPA) del test Xpert MTB/XDR rispetto al saggio Xpert MTB/RIF per il rilevamento di MTB sono rispettivamente del 98,9% e del 93,8%.

Tabella 7. Saggio Xpert MTB/XDR vs. Xpert MTB/RIF per il rilevamento di MTB

		Xpert MTB/RIF Saggio		
		MTB Rilevata (MTB detected)	MTB non rilevata (MTB not detected)	Totale
Xpert MTB/XDR	MTB Rilevata (MTB detected)	273	2 ^a	275
	MTB non rilevata (MTB not detected)	3 ^b	30	33
	Totale	276	32	308
PPA		98,9% (IC al 95%: 96,9-99,6)		
NPA		93,8% (IC al 95%: 79,9-98,3)		

^a I soggetti erano in terapia prolungata per tubercolosi al momento della raccolta del campione.

^b I campioni sono stati rilevati al di sotto del limite di rilevamento del test Xpert MTB/XDR.

La Tabella 8 mostra che la PPA e la NPA del test Xpert MTB/XDR relativo al test Xpert MTB/RIF Ultra per il rilevamento di MTB sono rispettivamente del 99,5% e del 100,0%.

Tabella 8. Xpert MTB/XDR vs. Xpert MTB/RIF Ultra per il rilevamento di MTB

		Xpert MTB/RIF Ultra		
		MTB Rilevata (MTB detected)	MTB non rilevata (MTB not detected)	Totale
Xpert MTB/XDR	MTB Rilevata (MTB detected)	207	0	207
	MTB non rilevata (MTB not detected)	1 ^a	14	15
	Totale	208	14	222
PPA		99,5% (IC al 95%: 97,3-99,9)		

	Xpert MTB/RIF Ultra		
	MTB Rilevata (MTB detected)	MTB non rilevata (MTB not detected)	Totale
	NPA	100,0% (IC al 95%: 78,5-100,0)	

^a Il risultato Xpert MTB/RIF Ultra è stato **Rilevata traccia di MTB (MTB Trace Detected)**.

Delle 531 sessioni del test Xpert MTB/XDR eseguite nell'ambito di questo studio, 15 hanno fornito risultati non determinati (**ERRORE (ERROR), (NON VALIDO) INVALID, o NESSUN RISLTATO (NO RESULT)**) al primo tentativo. Dopo la ripetizione del test di questi 15 campioni di analisi, un risultato è rimasto incerto. Il tasso di incerti al test iniziale è stato del 2,8% (15/531) e il tasso di incerti al test finale è stato dello 0,2% (1/531).

È stato condotto uno studio clinico multicentrico (Studio clinico 2) per valutare le prestazioni del test Xpert MTB/XDR relativamente al pDST e al sequenziamento per il rilevamento di resistenza a INH, ETH, FLQ e SLID (AMK, KAN e CAP) in campioni di analisi di espettorato. Sono stati arruolati campioni di analisi di espettorato prelevati secondo un disegno prospettico da quattro centri con elevata prevalenza di TB MDR. Sono stati analizzati per farmacoresistenza i campioni di analisi di espettorato non trattati e i campioni di analisi isolati da coltura MGIT con nota positività dopo coltura MTB.

La Tabella 9 mostra la sensibilità e la specificità del test Xpert MTB/XDR rispetto a pDST per la resistenza a tutti i farmaci in campioni di analisi di espettorato. La sensibilità è stata >90% per INH, FLQ e KAN, >85% AMK, >70% per CAP e >50% per ETH. La specificità è stata ≥ 92% per tutti i farmaci.

Tabella 9. Xpert MTB/XDR vs. pDST per la farmacoresistenza (campioni di analisi prospettici)

Farmaci	N	TP	FN	TN	FP	Sensibilità (%)	IC al 95%	Specificità (%)	IC al 95%
INH	587	452	24	106	5	95,0	92,6- 96,6	95,5	89,9- 98,1
FLQ	583	203	13	347	20	94,0	90,0- 96,4	94,6 ^a	91,7- 96,4
AMK	571	54	9	500	8	85,7	75,0- 92,3	98,4	96,9- 99,2
KAN	573	155	14	372	32	91,7	86,6- 95,0	92,1 ^b	89,0- 94,3
CAP	573	50	17	503	3	74,6	63,1- 83,5	99,4	98,3- 99,8
ETH	588	169	148	258	13	53,3 ^c	47,8- 58,7	95,2	92,0- 97,2

^a Diversi campioni di analisi con mutazioni del promotore di eis e del gene wild type rrs sono stati rilevati dal test come suscettibili al pDST e resistenti, con conseguente minore specificità.

^b Diversi campioni di analisi con mutazioni del promotore di eis e del gene wild type rrs sono stati rilevati dal test come suscettibili al pDST e resistenti, con conseguente minore specificità.

^c La refertazione della resistenza all'ETH si basa soltanto sul rilevamento di mutazioni del promotore di inhA, con conseguente minore sensibilità.

La Tabella 10 mostra la sensibilità e la specificità del test Xpert MTB/XDR rispetto al sequenziamento per la resistenza a tutti i farmaci in campioni di analisi di espettorato. La sensibilità è stata >90% per INH, FLQ e KAN (approssimata dall'89,5%), >70% AMK, >65% per CAP e >95% per ETH. La specificità è stata ≥ 98% per tutti i farmaci.

Tabella 10. Xpert MTB/XDR vs. sequenziamento per la farmacoresistenza (campioni di analisi prospettici)

Farmaci	N	TP	FN	TN	FP	Sensibilità (%)	IC al 95%	Specificità (%)	IC al 95%
INH	515	411	17	85	2	96,0	93,7- 97,5	97,7	92- 99,4
FLQ	513	201	6	303	3	97,1	93,8- 98,7	99,0	97,2- 99,7
AMK	501	50	18	430	3	73,5	62- 82,5	99,3	98- 99,8
KAN	503	170	20	308	5	89,5	84,3- 93,1	98,4	96,3- 99,3
CAP	504	45	23	435	1	66,2	54,3- 76,3	99,8	98,7- 100

Farmaci	N	TP	FN	TN	FP	Sensibilità (%)	IC al 95%	Specificità (%)	IC al 95%
ETH	517	160	6	347	4	96,4	92,3- 98,3	98,9	97,1- 99,6

18.2 Campioni di analisi MGIT

Lo studio clinico multicentrico (Studio clinico 2) è stato svolto anche per valutare le prestazioni del test Xpert MTB/XDR rispetto a pDST e al sequenziamento per il rilevamento di resistenza a INH, ETH, FLQ e SLID (AMK, KAN e CAP) in campioni di analisi positivi per MTB. Sono stati arruolati campioni di analisi di espettorato prelevati secondo un disegno prospettico da quattro centri con elevata prevalenza di TB MDR. I campioni di analisi di espettorato non trattati e gli isolati da coltura MGIT di ciascun soggetto sono stati testati con Xpert MTB/XDR. Dopo analisi diretta con Xpert MTB/XDR, campioni di analisi di espettorato decontaminato e concentrato sono stati inoculati in terreni di coltura MGIT e incubati per colture positive per MTB. Gli isolati da coltura MGIT positivi sono stati testati utilizzando il test Xpert MTB/XDR. Gli isolati da coltura MGIT sono stati conservati a 2-8 °C prima del test e la maggior parte dei campioni di analisi (96,9%) è stata analizzata entro 2 mesi dalla positività della coltura MGIT.

La Tabella 11 mostra la sensibilità e la specificità del test Xpert MTB/XDR relativo alla pDST per tutte le farmacoresistenze. La sensibilità è stata >90% per INH, FLQ e KAN, >85% AMK, >75% per CAP e 55% per ETH. La specificità è stata ≥ 92% per tutti i farmaci.

Tabella 11. Xpert MTB/XDR vs. pDST per la farmacoresistenza (positivi da coltura di MGIT)

Farmaci	N	TP	FN	TN	FP	Sensibilità (%)	IC al 95%	Specificità (%)	IC al 95%
INH	596	459	23	109	5	95,2	92,9- 96,8	95,6	90,1- 98,1
FLQ	594	208	12	356	18	94,5	90,7- 96,9	95,2	92,5- 96,9
AMK	593	57	8	520	8	87,7	77,5- 93,6	98,5	97,0- 99,2
KAN	594	163	11	388	32	93,7	89,0- 96,4	92,4 ^a	89,4- 94,6
CAP	595	52	17	524	2	75,4	64,0- 84,0	99,6	98,6- 99,9
ETH	597	177	145	258	17	55,0	49,5- 60,3	93,8	90,3- 96,1

^a Diversi campioni di analisi con mutazioni del promotore di eis e del gene wild type rrs sono stati rilevati dal test come suscettibili al pDST e resistenti, con conseguente minore specificità.

La Tabella 12 mostra la sensibilità e la specificità del test Xpert MTB/XDR relativamente al sequenziamento per la farmacoresistenza. La sensibilità è stata >96% per INH, FLQ e ETH, >85% per KAN, >70% per AMK e >62% per CAP. La specificità è stata ≥ 97% per tutti i farmaci.

Tabella 12. Xpert MTB/XDR vs. sequenziamento per la farmacoresistenza (positivo da coltura di MGIT)

Farmaci	N	TP	FN	TN	FP	Sensibilità (%)	IC al 95%	Specificità (%)	IC al 95%
INH	522	418	15	88	1	96,5	94,4- 97,9	98,9	93,9- 99,8
FLQ	521	205	5	309	2	97,6	94,5- 99,0	99,4	97,7- 99,8
AMK	520	52	20	446	2	72,2	61,0-81,2	99,6	98,4- 99,9
KAN	520	177	20	319	4	89,8	84,8- 93,3	98,8	96,9- 99,5
CAP	522	45	27	450	0	62,5	51,0- 72,8	100,0	99,2- 100,0
ETH	523	167	4	344	8	97,7	94,1- 99,1	97,7	95,6- 98,8

Delle 1211 sessioni del test Xpert MTB/XDR eseguite nell'ambito di questo studio (606 su campioni di analisi di espettorato, 605 su campioni di analisi MGIT), 35 hanno dato risultati incerti al test iniziale. Dopo la ripetizione del test di questi 35 campioni di analisi, due sono rimasti incerti. Il tasso di incerti al test iniziale è stato del 2,9% (35/1211) e il tasso di incerti al test finale è stato dello 0,2% (2/1211).

19 Prestazioni analitiche

19.1 Sensibilità analitica (limite di rilevamento)

Sono stati condotti studi per determinare il limite di rilevamento (LoD) analitico del test Xpert MTB/XDR con due lotti di reagenti nell'arco di tre giorni di analisi. Un risultato MTB positivo si basa sul rilevamento di una singola copia del bersaglio *inhA*. Il LoD superiore osservato per ceppo e per lotto, determinato tramite analisi probit, è stato selezionato per la verifica. La verifica del LoD stimato è stata eseguita su un lotto di reagente nel corso di tre giorni di analisi al minimo. Il LoD è stato stabilito *utilizzando un membro rappresentativo di MTBC, Mycobacterium bovis BCG (Bacille Calmette-Guerin)*, inoculato in espettorato negativo per MTB non trattato e in sedimento di espettorato negativo per MTB, sedimentato concentrato.

Il LoD è la concentrazione minima segnalata in CFU/ml che può essere distinta in modo riproducibile dai campioni negativi con una confidenza $\geq 95\%$. Sono stati valutati almeno 20 replicati a 5-8 concentrazioni con due diversi lotti di reagenti nel corso di 3 giorni e il LoD è stato determinato utilizzando l'analisi Probit.

Il LoD superiore osservato per ciascun tipo di campione di analisi e per lotto, determinato tramite analisi Probit, è stato selezionato per la verifica. La verifica del LoD stimato è stata eseguita su un lotto di reagente nel corso di tre giorni di analisi al minimo con una dichiarazione basata su un minimo di 19 replicati positivi su 20. Le stime del punto del LoD in CFU/ml sono riportate nella Tabella 13.

Tabella 13. Sensibilità analitica (limite di rilevamento)

Tipo di campione di analisi	Stima del punto del LoD, CFU/ml
espettorato non trattato	136
Sedimento	86

19.2 Specificità analitica (esclusività)

La specificità analitica del test Xpert MTB/XDR è stata valutata analizzando un pannello di 57 microrganismi distinti in 21 batteri, 1 fungo, 7 virus e 28 micobatteri non tubercolari (NTM) rappresentanti comuni patogeni respiratori o patogeni potenzialmente presenti nelle vie aeree e/o nella flora orofaringea. Sono state analizzate tre replicati di ogni ceppo batterico e di lievito a concentrazioni $\geq 1 \times 10^6$ UFC/ml. Tutti i virus sono stati analizzati a concentrazioni $\geq 1 \times 10^5$ (dose infettante in coltura tissutale) TCID₅₀/ml. Per 2 ceppi batterici e 1 ceppo micotico sono stati analizzati il DNA o l'RNA a concentrazioni $\geq 10^6$ copie/ml per mancanza di disponibilità di microrganismi interi o accesso impossibile dovuto a restrizioni di biosicurezza. Sono stati analizzati tre replicati di ciascun virus a concentrazioni $\geq 1 \times 10^5$ TCID₅₀/ml. La specificità analitica è stata del 100%. Gli organismi analizzati sono elencati nella Tabella 1, Tabella 2 e nella Tabella 3. Nessuno dei microrganismi analizzati ha generato una reattività crociata con la sonda di rilevamento MTB, dando luogo a un risultato **MTB NON RILEVATA (MTB NON DETECTED)** per tutti i microrganismi e per tutti i replicati analizzati. Le tabelle riportate di seguito elencano i microrganismi per il saggio di specificità analitica. *Aspergillus fumigatus* è stato sottoposto a una valutazione analitica e non ha evidenziato alcuna interferenza o reattività crociata. Dall'analisi *in silico* non è emersa alcuna reattività crociata con altre specie fungine.

Tabella 14. Specificità analitica del Xpert MTB/XDR (batteri/funghi)

Microrganismo
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Chlamydomypha pneumoniae</i> ^a
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>

Microrganismo
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>

^a DNA genomico

Tabella 15. Specificità analitica del Xpert MTB/XDR (virus)

Microrganismo
Coronavirus 229E
Metapneumovirus umano (hMPV) 16 tipo A1
Virus parainfluenzale tipo 1
Virus parainfluenzale tipo 2
Virus parainfluenzale tipo 3
Virus respiratorio sinciziale
Rhinovirus 1A

Tabella 16. Specificità analitica del Xpert MTB/XDR (NTM)

Microrganismo
<i>Mycobacterium asiaticum</i>
<i>Mycobacterium avium</i> NJH
<i>Mycobacterium celatum</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>Mycobacterium flavescens</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i> sottosp. <i>Fortuitum</i>
<i>Mycobacterium gastri</i>

Microrganismo
<i>Mycobacterium gordonae</i> (3 ceppi. Vedere Tabella 20.)
<i>Mycobacterium genavense</i>
<i>Mycobacterium haemophilum</i>
<i>Mycobacterium malmoeense</i>
<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Mycobacterium phlei</i>
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>Mycobacterium simiae</i>
<i>Mycobacterium szulgai</i>
<i>Mycobacterium terrae</i>
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>
<i>Mycobacterium triviale</i>
<i>Mycobacterium vaccae</i>
<i>Mycobacterium xenopi</i>
<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Mycobacterium abscessus</i>
<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Mycobacterium kansasii</i>

19.3 Reattività analitica (inclusività)

La reattività analitica (inclusività) del test Xpert MTB/XDR è stata valutata utilizzando un pannello filogeneticamente diverso composto da ceppi di MTB sensibile e farmaco resistente per la valutazione dell'accuratezza dei risultati di farmaco sensibilità del test. Il pannello dei ventidue (22) ceppi del complesso MTB (MTBC) includeva otto (8) ceppi farmaco sensibili con geni target wild type (Tabella 17) e quattordici (14) ceppi farmacoresistenti ben caratterizzati (Tabella 18). Tutti i ceppi sono stati analizzati in triplicato a concentrazioni pari o prossime a 3X LoD del target promotore di *inhA*. Il numero di copie analizzato per i lisati di DNA genomico è stato definito in base a un saggio con coloranti fluorescenti leganti specifici per DNA a doppio filamento (dsDNA).

I ceppi farmaco sensibili sono stati analizzati e includono cinque ceppi di MTB (AR2, GD139, AH1, HR36, H37Rv) e tre specie di micobatteri del complesso MTB (*M. bovis*, *M. canetti* e *M. microti*). I ceppi di MTB sono stati selezionati per rappresentare ampiamente il range di diversità genetica e ne includono uno rappresentativo di ciascuna principale linea filogenetica basata su gruppi di cluster SNP (SCG)²⁰.

I 14 ceppi di MTB farmacoresistenti sono stati analizzati utilizzando i lisati di DNA genomico da campioni di analisi ben caratterizzati che contengono 16 mutazioni canoniche clinicamente significative con almeno una delle otto regioni bersaglio del test. Queste mutazioni sono comunemente presenti nei ceppi multiresistenti o ad estesa farmacoresistenza di MTB in tutto il mondo, ad eccezione di una mutazione nel gene *gyrB*.

La Tabella 17 riassume i risultati relativi a ceppi farmaco sensibili che mostrano i risultati corretti per ciascuno dei singoli analiti nel test. Tutti i membri del pannello hanno generato **MTB RILEVATA; RESISTENZA NON RILEVATA (MTB DETECTED; RESISTANCE NOT DETECTED)**. Il test Xpert MTB/XDR ha correttamente identificato tutti i replicati dei ceppi analizzati vicino al limite di rilevamento con risultati wild type per tutte le sonde eccetto *oxyR-ahpC*. Poiché il target *oxyR-ahpC* ha un LoD maggiore di quello degli altri target nel test, alcuni replicati analizzati non hanno generato risultati Tm.

I risultati nella Tabella 18 mostrano che il test ha identificato correttamente anche le mutazioni per resistenza previste in tutti e 14 i ceppi resistenti a isoniazide con mutazioni nel promotore di *inhA*, *katG* e nella regione intergenica *oxyR-ahpC*; resistenza a SLID con mutazioni nella regione del promotore di *rrs* e *eis*; e resistenza a FLQ con mutazioni in *gyrA*.

Tabella 17. Reattività analitica (inclusività) per ceppi farmaco sensibili

Campione	Linea del ceppo	<i>inhA</i>	<i>katG</i>	<i>fabG1</i>	<i>oxyR-ahpC</i> ^a	<i>gyrA1</i>	<i>gyrA2</i>	<i>gyrA3</i>	<i>gyrB2</i>	<i>rrs</i>	<i>eis</i>
(<i>M.bovis</i> BCG)	Non assegnato	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	RESPINTO (FAIL)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>M.bovis</i>	Non assegnato	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	RESPINTO (FAIL)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB</i> (AR2)	2	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB</i> (GD139)	3	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB</i> (AH1)	4	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB</i> (HR36)	5	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB</i> (HR37Rv)	4	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	RESPINTO (FAIL)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>M.canetti</i>	Non assegnato	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	RESPINTO (FAIL)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>M.microti</i>	Non assegnato	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)

^a Il LoD per *oxyR-ahpC* è maggiore di quello di *inhA* usato per la determinazione della positività a MTB. "AMMESSO (PASS)" indica che tutti i replicati analizzati hanno generato la Tm wild type prevista; "RESPINTO (FAIL)" indica che almeno uno o più replicati non hanno generato valori di Tm.

Tabella 18. Reattività analitica (inclusività) per ceppi farmacoresistenti (n. risultati positivi / totale analizzato)

ID ceppo	Gene	Mutazione prevista	MTB Rilevata (MTB detected)	Rilevata Tm da sonda del mutante (n. positivi/analizzati)	Risultati corretti RESISTENZA RILEVATA (RESISTANCE DETECTED) (n. positivi/analizzati)
Clinici	<i>gyrA</i>	GAC 94 TAC	3 / 3	<i>gyrA1</i> -MutB (3/3); <i>gyrA3</i> -MutC (3/3)	FLQ [3/3]
	<i>katG</i>	AGC 315 ACC		<i>katG</i> Mut (3/3)	INH [3/3]
	<i>fabG1</i>	G609A		<i>fabG1</i> Mut (3/3)	INH [3/3]
Clinici	<i>gyrA</i>	GGC 88 GCC, GCG 90 GTG, TCG 91 CCG	3 / 3	<i>gyrA1</i> -MutB (2/3), ^a <i>gyrA1</i> -MutC (2/3), <i>gyrA2</i> -MutA (3/3), <i>gyrA3</i> -MutB (1/3)	FLQ [3/3]
	<i>katG</i>	AGC 315 ACC		<i>katG</i> Mut (3/3)	INH [3/3]
	<i>rrs</i>	A1401G		<i>rrs</i> -Mut (3/3)	AMK, CAP, KAN [3/3]
Clinici	<i>gyrA</i>	GAC 94 GGC	3 / 3	<i>gyrA3</i> -MutB (3/3)	FLQ [3/3]
	<i>katG</i>	AGC 315 ACC		<i>katG</i> Mut (3/3)	INH [3/3]
	<i>rrs</i>	A1401G		<i>rrs</i> -Mut (3/3)	AMK, CAP, KAN [3/3]

ID ceppo	Gene	Mutazione prevista	MTB Rilevata (MTB detected)	Rilevata Tm da sonda del mutante (n. positivi/analizzati)	Risultati corretti RESISTENZA RILEVATA (RESISTANCE DETECTED) (n. positivi/analizzati)
14-14194	gyrA	GAC 94 GCC	3 / 3	gyrA1-MutA, gyrA2-MutA	FLQ [3/3]
	katG	AGC 315 ACC		katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA-Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]
15-14175	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	eis	-10G/A		eis-Mut (3/3)	KAN [3/3]
15-14191	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	eis	-10G/A		eis-Mut (3/3)	KAN [3/3]
16-05612	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA-Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]
	eis	-12C/T		eis-Mut (3/3)	KAN [3/3]
16-05613	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA-Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]
	eis	-12C/T		eis-Mut (3/3)	KAN [3/3]
14-13764	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	ahpC	-48G/A		ahpc-Mut (3/3)	INH [3/3]
14-13806	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	ahpC	-48G/A		ahpc-Mut (3/3)	INH [3/3]
Clinici	gyrA	GCG 90 GTG, GAC 94 GGC	3 / 3	gyrA3-MutB (3/3)	FLQ [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA-Mut (3/3)	INH [3/3]
	ahpC	G-6A		ahpC (2/3) ^b	INH [3/3]
Clinici	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG Mut (3/3)	INH [3/3]
Clinici	gyrB2	ACC 539 AAC	3 / 3	gyrB2 WT ^c	*Nessuna resistenza rilevata (No resistance detected) [0/3]
	rrs	A1401G		rrs-Mut (3/3)	AMK, CAP, KAN [3/3]
	gyrA	GCG 90 GTG		gyrA1 MuB (3/3), gyrA2 MutA (3/3), gyrA3 MutB (3/3)	FLQ [3/3]
	ahpC	g -6 a		ahpC Mut (3/3)	INH [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]
Clinici	gyrA	TCG 91 CCG	3 / 3	gyrA1-MutB (3/3), gyrA2-MutA (3/3), gyrA3-MutC (3/3)	FLQ [3/3]

ID ceppo	Gene	Mutazione prevista	MTB Rilevata (MTB detected)	Rilevata Tm da sonda del mutante (n. positivi/analizzati)	Risultati corretti RESISTENZA RILEVATA (RESISTANCE DETECTED) (n. positivi/analizzati)
	inhA	C -15 T		inhA Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]

- ^a Questo campione che contiene tre diverse mutazioni nel gene *gyrA* non ha generato sempre le Tm dei mutanti per tutte e tre le sonde *gyrA*. Tuttavia, per effettuare una corretta determinazione della resistenza, almeno una sonda deve generare una Tm del mutante. La determinazione è stata effettuata correttamente per tutti i replicati, poiché almeno una sonda *gyrA*, quando testata, ha sempre generato almeno una Tm del mutante.
- ^b Questo campione è un mutante doppio katG / ahpC. Il replicato con una Tm del mutante ahpC mancante è stato denominato INH-R a causa della presenza della mutazione katG, rilevata dal test.
- ^c Il test non rileva questa mutazione specifica. Tuttavia esiste una limitata evidenza clinica secondo cui questa mutazione potrebbe di fatto contribuire allo sviluppo di resistenza a FLQ (mutazione a bassa affidabilità per resistenza a FLQ).

19.4 Studio sulle sostanze interferenti

Le prestazioni del test Xpert MTB/XDR sono state valutate in presenza di 35 sostanze potenzialmente interferenti che potrebbero essere presenti nell'espettorato. Le classi di sostanze potenzialmente interferenti includono sostanze endogene che potrebbero essere presenti nel campione di analisi e sostanze esogene che potrebbero essere introdotte nel campione di analisi. Soluzioni isotoniche o ipertoniche, broncodilatatori e broncodilatatori inalati comunemente usati per il prelievo di espettorato indotto sono stati analizzati e non interferiscono con il test. L'induzione di soluzione fisiologica potrebbe generare un numero insufficiente di microrganismi recuperati e potrebbe influire sul rilevamento di *M. tuberculosis*.

Le sostanze analizzate sono elencate nella Tabella 19, con indicazione dei principi attivi e delle concentrazioni usate nei test. Campioni negativi (n=8) sono stati analizzati per ciascuna sostanza per determinare l'effetto sulle prestazioni del controllo per il trattamento dei campioni (SPC). I campioni positivi (n = 8) *Mycobacterium bovis*, *Bacille Calmette-Guerin (BCG)* inoculati a un limite di rilevamento analitico 3 volte maggiore per positività Tb sono stati analizzati per sostanza. Tutte le sostanze sono state analizzate nel background di espettorato umano in pool negativo per MTB incluso in questo studio. Tutti i replicati positivi e negativi sono stati identificati correttamente mediante l'impiego del test Xpert MTB/XDR, fatta eccezione di Zicam gel (50% p/v; con risultato **MTB NON RILEVATA (MTB NOT DETECTED)** nell'11,1% dei replicati analizzati).

Tabella 19. Sostanze potenzialmente interferenti nel test Xpert MTB/XDR

Sostanza/Classe	Descrizione/Principio attivo	Concentrazione analizzata
Sangue (umano)	Sangue 5% (v/v)	5% (v/v)
DNA umano/Cellule	Linea cellulare HELA 229	10 ⁶ cellule/ml
Globuli bianchi (umani)	Matrice WBC/Pus (30% di buffy-coat [strato leucocitario]; 30% di plasma; 40% di PBS) ^a	100% (v/v)
Antimicotico; Antibiotico	Nistatina 500KU (100%)	20% (v/v)
Collutorio germicida	Clorexidina gluconato (0,12%) risciacquo orale, USP	20% (v/v)
Reagenti per il trattamento di campioni	Cloruro di cetilpiridinio, 1% in NaCl 2%	0,5% (v/v) in NaCl 1%
Reagenti per il trattamento di campioni	Cloruro di cetilpiridinio, 1% in NALC 2%	0,5% (v/v) in NALC 1%
Reagenti per il trattamento di campioni	Cloruro di cetilpiridinio, 1% in NALC 2% più 25 mM di citrato	0,5% (v/v) in 1% NALC più 12,5 mM citrato
Acido gastrico	soluzione in acqua con pH da 3 a 4, neutralizzata con bicarbonato di sodio	100% (v/v)

Sostanza/Classe	Descrizione/Principio attivo	Concentrazione analizzata
Anestetici (intubazione endotracheale)	Lidocaina HCl 4%	4% (v/v)
Soluzione nebulizzante	NaCl 5% (p/v)	5% (p/v)
Mucina	Mucina 5% (p/v)	5% (p/v)
Antibatterico sistemico	Levofloxacin 25 mg/ml	5 mg/ml
Corticosteroidi nasali	Fluticasone 500 mcg/spruzzo	5 µg/ml;
Broncodilatatori inalati	Solfato di albuterolo (2 mg/5 ml)	100 µg/ml
Anestetici orali	Orajel (20% benzocaina)	5% (p/v)
Farmaci antivirali	Acyclovir	50 µg/ml
Unguento nasale antibiotico	Neosporina (Bacitracina 400U, Neomicina 3,5 mg, Polimixina B 5000U)	5% (p/v)
Tabacco	Nicogel 40% estratto di tabacco	0,5%
Farmaci antitubercolari	Streptomycin 1 mg/ml	25 µg/ml
Farmaci antitubercolari	Etambutolo 1 mg/ml	50 µg/ml
Farmaci antitubercolari	Isoniazide 50 mg/5 ml	50 µg/ml
Espettoranti orali	Guaifenesina (400 mg/compressa)	5 mg/ml
Farmaci antitubercolari	Pirazinamide (500 mg/compressa)	100 µg/ml
Gel nasale (omeopatico)	Zicam gel	50% (p/v)
		20% (p/v)
Spray nasale	Fenilefrina 1%	0,5% (v/v)
Farmaci antitubercolari	Rifampicina (300 mg/compressa)	25 µg/ml
Farmaco per il sollievo dalle allergie (omeopatico)	Olio dell'albero del tè puro al 100% (<5% Cineole, >35% Terpinin-4-ol)	0,5% (v/v)
Soluzione nebulizzante	Pentamidina isetionato	300 ng/ml
Farmaci antitubercolari	Amoxicillina	25 µg/ml
Broncodilatatore	Epinefrina	1 mg/ml
Farmaci antitubercolari	Amicacina	70 ug/ml
Farmaci antitubercolari	Capreomicina	50 ug/ml
Farmaci antitubercolari	Canamicina	50 ug/ml
Farmaci antitubercolari	Etionamide	50 ug/ml
FluMist Qual Nasal	Vaccino vivo per il virus influenzale - nasale	5%

19.5 Studio sulla contaminazione da carry-over

È stato condotto uno studio per dimostrare che l'impiego delle cartucce Xpert MTB/XDR chiuse monouso non genera contaminazione crociata da carry-over. Lo studio prevedeva il trattamento di un campione negativo subito dopo il trattamento di un'elevata concentrazione di *Mycobacterium bovis-Bacille Calmette-Guerin* (BCG) a $1 \times 10^{+6}$ CFU/ml in campione di espettorato umano all'interno dello stesso modulo GeneXpert. Questo schema di analisi è stato ripetuto almeno 20 volte in due moduli GeneXpert per un totale di 41 sessioni analitiche, che hanno prodotto 20 campioni positivi e 21 campioni negativi per modulo.

Tutti e 20 i campioni positivi sono stati refertati correttamente come **MTB RILEVATA (MTB DETECTED); Resistenza a INH NON RILEVATA (INH Resistance NOT DETECTED); Resistenza a FLQ NON RILEVATA (FLQ Resistance NOT DETECTED); Resistenza a AMK NON RILEVATA (AMK Resistance NOT DETECTED); Resistenza a KAN NON RILEVATA (KAN Resistance NOT DETECTED); Resistenza a CAP NON RILEVATA (CAP Resistance NOT DETECTED); Resistenza a ETH NON RILEVATA (ETH Resistance NOT DETECTED)**. Tutti e 21 i campioni negativi sono stati refertati correttamente come **MTB NON RILEVATA (MTB NOT DETECTED)**. Alle condizioni di questo studio, non è emersa alcuna evidenza di contaminazione da carry-over dall'analisi di un campione BCG a positività molto elevata alla concentrazione di $1,0 \times 10^{+6}$ CFU/ml.

19.6 Studio dell'interferenza competitiva

L'interferenza competitiva del test causata dalla presenza di elevate concentrazioni di micobatteri non tubercolari (NTM) al rilevamento di bassi livelli di MTB nel test Xpert MTB/XDR è stata valutata tramite l'analisi del membro rappresentativo di MTBC, BCG a $\sim 3 \times \text{LoD}$ (411 CFU/ml) in presenza di ceppi di NTM diversi a una concentrazione di $1 \times 10^{+6}$ CFU/ml in un background di controllo negativo in tampone. La positività per MTB si basa sul rilevamento della melt peak height valida del promotore di *inhA* e della temperatura di picco di fusione. Il rilevamento della resistenza si basa su un valore valido di melt peak height della mutazione e temperatura di picco di fusione della mutazione per i singoli analiti (*inhA*, *katG*, *gyrA1*, *gyrA2*, *gyrA3*, *gyrB2* e *eis*). Gli analiti *oxyR-ahpC* e *fabG1* sono stati esclusi a causa della bassa sensibilità e *rrs* è stato escluso a causa di nota interferenza con la microflora. Tutti i campioni contenenti BCG devono avere risultati come **MTB RILEVATA (MTB DETECTED); Resistenza a INH NON RILEVATA (INH Resistance NOT DETECTED); Resistenza a FLQ NON RILEVATA (FLQ Resistance NOT DETECTED); Resistenza a AMK NON RILEVATA (AMK Resistance NOT DETECTED); Resistenza a KAN NON RILEVATA (KAN Resistance NOT DETECTED); Resistenza a CAP NON RILEVATA (CAP Resistance NOT DETECTED); Resistenza a ETH NON RILEVATA (ETH Resistance NOT DETECTED)**.

Sono stati analizzati quattro replicati di ciascuna condizione del test di miscela competitiva NTM/BCG insieme a una condizione di controllo positivo con la sola BCG a $\sim 3 \times \text{LoD}$. Nessuno dei ceppi NTM analizzati ha interferito con il rilevamento di 411 CFU/ml di BCG e hanno generato il risultato corretto come citato sopra. Tuttavia, alle condizioni di questo studio, sono stati osservati effetti inibitori competitivi in presenza di solo uno dei due ceppi di *M. marinum* (ATCC 0927) analizzati. L'interferenza con le sonde *gyrA2* è stata osservata solo a concentrazioni di sfida $>10^4$ CFU/ml determinando risultati di resistenza a FLQ INCERTI (INDETERMINATE) a queste concentrazioni particolarmente elevate. Consultare Sezione 17. Limitazioni per ulteriori informazioni.

Tabella 20. Interferenza competitiva da NTM al rilevamento di MTB e rilevamento di farmaco sensibilità

Condizione del test / ID ceppo NTM	NTM CFU/ml	MTB Rilevata (MTB detected)	INH	FLQ	AMK	KAN	CAP	ETH
<i>MTB + M. avium</i> / (NJH)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.gastri</i> / (ATCC 15754)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.gordonae</i> / (NJH)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.gordonae</i> / (ATCC 14470)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.gordonae</i> / (ATCC 35760)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.marinum</i> / (NJH)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.marinum</i> / (ATCC 0927)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	RESPINTO (FAIL)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
	10E+05	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	RESPINTO (FAIL)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
	10E+04	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
	10E+03	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.xenopi</i> / (ATCC 700084)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.avian</i> / (ATCC 15769)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.intracellulare</i> / (ATCC 35771)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.abscessus</i> / (ATCC 19977)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<i>MTB + M.kansasii</i> / (ATCC 12478)	10E+06	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)	AMMESSO (PASS)
<p>“AMMESSO” (PASS) indica che tutti i replicati analizzati hanno generato il risultato previsto “RESISTENZA NON RILEVATA” (RESISTANCE NOT DETECTED) per i farmaci di rilievo;</p> <p>“RESPINTO” (FAIL) indica che almeno uno o più replicati hanno generato un risultato “RESISTENZA INCERTA” (RESISTANCE INDETERMINATE) per quel farmaco particolare.</p>								

19.7 Equivalenza tra espettorato fresco ed espettorato congelato

L'equivalenza fra espettorato fresco ed espettorato congelato con il test Xpert MTB/XDR è stata valutata analizzando le cellule di *M.bovis* – Bacillus Calmette- Guerin (BCG) in un background di espettorato non trattato negativo per MTB in pool a due concentrazioni rappresentative di 3X LoD (400 CFU/ml) e 1000XLoD ($1,3 \times 10^5$ CFU/ml). I campioni di replicato a

ogni concentrazione sono stati congelati e conservati a -80 °C e almeno 8 replicati scongelati e analizzati dopo un periodo di conservazione di 1 settimana, 2 settimane, 1 mese, 3 mesi, 6 mesi e 9 mesi. I risultati sono stati confrontati con espettorato non trattato inoculato con le stesse concentrazioni analizzate all'intervallo di osservazione zero prima del congelamento.

Le prestazioni del saggio non sono state intaccate e i risultati corretti sono stati ottenuti per tutti i replicati a un 3X LoD maggiore dopo la conservazione a -80 °C a 2 settimane, 3 mesi e 6 mesi. Un singolo replicato all'intervallo di osservazione della settimana 1 ha restituito un risultato **Resistenza A INH incerta (INH-Resistance Indeterminate)** a causa di un dropout della sonda *katG* e un singolo replicato a 1 mese ha generato un dropout di *ahpC* ma risultati corretti sono stati osservati per tutti i replicati a 3 e a 6 mesi. Risultati corretti sono stati ottenuti all'intervallo di osservazione a 9 mesi a 3X LoD in 8 replicati su 9 (89%). Non sono stati osservati effetti sulle prestazioni del saggio quando l'espettorato con 1000X LoD è stato conservato a -80 °C a tutti gli intervalli di osservazione analizzati per 9 mesi. I risultati di questo studio supportano la conservazione a una temperatura di congelamento a -80 °C di espettorato non trattato per un periodo massimo di 6 mesi.

19.8 Inattivazione di micobatteri in campioni di espettorato

La capacità di disinfezione del reagente per il campione Xpert MTB è stata determinata utilizzando un metodo standardizzato quantitativo di coltura tubercolicida.²¹ I campioni di espettorato sono stati addizionati con un'elevata concentrazione di *M. bovis* vitale, miscelati con reagente per il campione in un rapporto di 2:1 e incubati per 15 minuti. Dopo l'incubazione, la miscela di reagente per il campione/espettorato è stata neutralizzata mediante diluizione e filtrazione e quindi sottoposta a coltura. La vitalità degli organismi *M. bovis* dall'espettorato trattato è stata ridotta di almeno 6 logaritmi rispetto al controllo non trattato.

Ciascun laboratorio deve determinare l'efficacia delle proprietà di disinfezione del reagente per il campione utilizzando propri metodi standardizzati e deve osservare le raccomandazioni delle normative di biosicurezza.

20 Precisione e riproducibilità

La precisione e la riproducibilità del test Xpert MTB/XDR è stata stabilita in uno studio multicentrico (tre siti), in cieco utilizzando un design nidificato multifattoriale. Lo studio consisteva in un pannello di campioni a cinque componenti e ciascun componente del pannello è stato preparato addizionando un ceppo MTB wild-type (WT) e un ceppo mutante MTB (MUT) in una matrice di espettorato artificiale. I ceppi WT e MUT sono stati ottenuti da plasmidi che trasportano sia MTB XDR wild-type o sequenze mutanti per i geni bersaglio del saggio, incapsulati in *E. coli* inattivato, fissato chimicamente.

I componenti del pannello sono stati preparati a ~1 x LoD e ~3 x LoD utilizzando le temperature di fusione (T_m) del bersaglio promotore *inhA* nel test Xpert MTB/XDR, che genera il risultato **MTB RILEVATA/NON RILEVATA (MTB DETECTED/NOT DETECTED)** a seconda della presenza o assenza della T_m specifica del promotore *inhA* wild-type o del mutante. I test sono stati condotti per sei giorni con tre lotti di cartucce Xpert MTB/XDR. Ogni sito disponeva di due operatori (OP1 e OP2) che eseguivano due sessioni ciascuna con due replicati/sessione ogni giorno. Un replicato era un test a cartuccia singola. La percentuale di concordanza per ciascun componente del pannello è riportata nella Tabella 21.

Tabella 21. Percentuale di concordanza di Xpert MTB/XDR per MTB e rilevamento di *inhA*

Campione	Centro 1			Centro 2			Centro 3			Concordanza totale per campione
	OP 1	OP 2	Totale parziale	OP 1	OP 2	Totale parziale	OP 1	OP 2	Totale parziale	
MTB MUT 1 x LoD	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	95,8% (23/24)	97,9% (47/48)	91,7% (22/24)	91,7% (22/24)	91,7% (44/48)	96,5% (139/144)
MTB MUT 3 x LoD	95,8% (23/24)	100% (24/24)	97,92% (47/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	99,3% (143/144)
MTB WT 1 x LoD	100% (24/24)	91,67% (22/24)	95,8% (46/48)	91,7% (22/24)	91,7% (22/24)	91,7% (44/48)	91,7% (22/24)	100% (24/24)	95,8% (46/48)	94,4% (136/144)
MTB WT 3 x LoD	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
NEG	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	95,8% (23/24)	97,9% (47/48)	99,3% (143/144)

Le prestazioni del test Xpert MTB/XDR in campioni del pannello con ceppi MTB WT e MUT a concentrazione bassa (~1 x LoD) e moderata (~3 x LoD) per ciascun bersaglio del gene in cui è stato rilevato l'MTB sono presentate nella Tabella 22.

Tabella 22. Percentuale di concordanza di Xpert MTB/XDR in campioni di analisi MTB di tipo MUT e WT

Farmaco	Percentuale di concordanza			
	MTB MUT 1x LoD (IC al 95%) [n concordante/ n totale]	MTB MUT 3x LoD (IC al 95%) [n concordante/ n totale]	MTB WT 1x LoD (IC al 95%) [n concordante/ n totale]	MTB WT 3x LoD (IC al 95%) [n concordante/ n totale]
INH	100,00% (97,3-100) [139/139]	100,00% (97,4-100,0) [143/143]	89,1% (82,6-93,4) [115/129]	99,3% (96,2-99,9) [143/144]
FLQ	87,80% (81,3-92,2) [122/139]	100,00% (97,4-100,0) [143/143]	81,4% (73,8-87,2) [105/129]	95,8% (91,2-98,1) [138/144]
ETH	100,00% (97,3-100) [139/139]	100,00% (97,4-100,0) [143/143]	99,2% (95,7-99,9) [128/129]	100,0% (97,4-100,0) [144/144]
AMK	100,00% (97,3-100) [139/139]	100,00% (97,4-100,0) [143/143]	91,5% (85,4-95,2) [118/129]	98,6% (95,1-99,6) [142/144]
CAP	99,30% (96,3-99,0) [138/139]	100,00% (97,4-100,0) [143/143]	98,4% (94,5-99,6) [127/129]	99,3% (96,2-99,9) [143/144]
KAN	100,00% (97,3-100) [139/139]	100,00% (97,4-100,0) [143/143]	91,5% (85,4-95,2) [118/129]	98,6% (95,1-99,6) [142/144]

21 Riferimenti bibliografici

1. OMS, Global Tuberculosis Report 2019. www.who.int/tb/publications/global_report
2. OMS, 2018, Rapid Communication: Key changes to treatment of multidrug- and rifampicin-resistant tuberculosis.
3. WHO, 2019, Rapid Communication: Key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis
4. Sulis G, Pai M (2020) Isoniazid-resistant tuberculosis: A problem we can no longer ignore. *PLoS Med* 17(1): e1003023
5. Soumitesh Chakravorty, Sandy S. Roh, et al Department of Medicine, New Jersey Medical School, Newark, New Jersey, USA Detection of Isoniazid-, Fluoroquinolone-, Amikacin-, and Kanamycin-Resistant Tuberculosis in an Automated, Multiplexed 10-Color Assay Suitable for Point-of-Care Use *J Clin Microbiol* Jan 2017 Volume 55 Issue 1.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Chosewood, LC and Wilson, DE (eds) (2009). HHS Publication number (CDC) 21-1112.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (fare riferimento all'ultima edizione).

8. Clinical and Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards). Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Document M48A (fare riferimento all'ultima edizione).
9. REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga, Elenco delle frasi di rischio, direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE (che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006).
10. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).
11. Kent PT, Kubica GP 1985. Public Health Mycobacteriology—A Guide for Level III Laboratory, Centers of Disease Control, Atlanta, Publication no. PB 86-216546
12. Camus JC, et al. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148:2967–73.
13. Zhang et al. 1996. Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):13212–13216
14. Maruri et al. 2012. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother*.
15. Vadwai V, Ajbani K, Jose M, Vineeth VP, Nikam C, Deshmukh M, Shetty A, Soman R, Rodrigues C. Can inhA mutation predict ethionamide resistance? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013 Jan;17(1):129-30. doi: 10.5588/ijtld.12.0511. Epub 2012 Nov 8. PubMed PMID: 23146620
16. Dunn JJ, Starke JR, Revell PA. 2016. Laboratory diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease in children. *J Clin Microbiol* 54:1434–1441. doi:10.1128/JCM.03043
17. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children, *Am J Respir Crit Care Med* Vol 161. pp 1376–1395, 2000.
18. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC (2015) Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. *PLoS ONE* 10(3): e0119628. doi:10.1371/journal.pone.0119628
19. Farhat MR, Jacobson KR, Franke MF, Kaur D, Sloutsky A, Mitnick CD, Murray M. 2016. Gyrase mutations are associated with variable levels of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 54:727–733. doi:10.1128/JCM.02775-15.
20. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*. 2007 May;7(5):328-37.
21. Banada, P. et.al. Containment of Bioaerosol Infection Risk by the Xpert MTB/RIF Assay and Its Applicability to Point of Care Settings. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010.48:10. 3551-3557.

22 Ubicazione delle sedi centrali Cepheid

Sede centrale globale

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

Telefono: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Sede centrale europea

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Telefono: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

23 Assistenza tecnica

Prima di contattarci

Prima di contattare il Supporto Tecnico di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:

- Nome del prodotto
- Numero di lotto
- Numero di serie dello strumento
- Messaggi di errore (se presenti)
- Versione del software e, se pertinente, codice riportato sull'etichetta di servizio (Service Tag) del computer

Stati Uniti d'America




















Telefono: + 1 888 838 3222
E-mail: techsupport@cepheid.com

Francia

Telefono: + 33 563 825 319
E-mail: support@cepheideurope.com

Le informazioni di contatto di tutti gli uffici di Supporto Tecnico di Cepheid sono disponibili nel sito: www.cepheid.com/en/support/contact-us

24 Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>
	Marchio CE - Conformità europea
	Non riutilizzare
	Codice lotto
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per n test
	Controllo
	Data di scadenza
	Limiti di temperatura
	Rischi biologici
	Attenzione
	Liquidi infiammabili
	Corrosione cutanea
	Tossicità riproduttiva e per gli organi
	Paese di produzione
	Rappresentante autorizzato in Svizzera
	Importatore



Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna,
Sweden



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



25 Cronologia delle revisioni

Sezione	Descrizione della modifica
Tabella dei simboli	Aggiunta dei simboli CH REP e Importatore e aggiunta di descrizioni nella tabella dei simboli. Aggiunta dei simboli CH REP e Informazioni sull'importatore con l'indirizzo svizzero.
Cronologia delle revisioni	Aggiornamento della tabella Cronologia delle revisioni.