

Xpert[®] MTB/RIF Ultra

REF GXMTB/RIF-ULTRA-10

REF GXMTB/RIF-ULTRA-50

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.

© 2017–2023 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.

© 2017–2023 Cepheid.

Per una descrizione delle modifiche apportate, vedere Sezione 21, Cronologia delle revisioni.

Xpert[®] MTB/RIF Ultra

Per uso diagnostico *in vitro*

1 Nome registrato

Xpert[®] MTB/RIF Ultra

2 Nome comune o usuale

Xpert MTB/RIF Ultra

3 Destinazione d'uso

Il test Xpert MTB/RIF Ultra, eseguito sul GeneXpert[®] Instrument Systems, è un test diagnostico *in vitro* nested-PCR (reazione a catena della polimerasi) real time, semiquantitativo, per il rilevamento del DNA del complesso *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in campioni di espettorato non trattato o sedimenti concentrati preparati da espettorato indotto o spontaneo. Nei campioni di analisi in cui viene rilevato il complesso *Mycobacterium tuberculosis*, il test Xpert MTB/RIF Ultra può anche rilevare mutazioni del gene *rpoB* associate alla resistenza alla rifampicina.

Il test Xpert MTB/RIF Ultra è indicato per l'uso con campioni prelevati da pazienti con sospetto clinico di tubercolosi (TB) e che non sono stati sottoposti a terapie anti TB o hanno ricevuto meno di 3 giorni di terapia negli ultimi 6 mesi. Questo test serve come ausilio diagnostico per la tubercolosi polmonare quando usato insieme a risultati clinici e ad altri esami di laboratorio.

4 Riepilogo e spiegazione

A livello mondiale, circa 1,7 miliardi di persone sono positive per MTB.¹ Nel 2018, 10,0 milioni di persone hanno sviluppato la malattia attiva e 1,45 milioni di persone sono decedute per causa sua.² La via di trasmissione della TB polmonare è l'aria, il che la rende altamente trasmissibile. Data la natura infettiva della TB polmonare, una diagnosi rapida e accurata è un elemento importante per il trattamento e il controllo della malattia.

Il trattamento prevede la somministrazione prolungata di farmaci multipli ed è in genere altamente efficace. Tuttavia, ceppi di *M. tuberculosis* possono diventare resistenti a uno o più farmaci, rendendo la cura molto più difficoltosa. Nella terapia anti TB vengono utilizzati quattro farmaci comuni di prima linea: l'isoniazide (INH), la rifampicina (RIF), l'etambutolo (EMB) e la pirazinamide (PZA). L'Organizzazione Mondiale della Sanità segnala che la resistenza alla RIF, di per sé, si riscontra raramente e che spesso indica resistenza a numerosi altri farmaci anti TB.³ La si rileva più comunemente in ceppi multiresistenti (MDR-TB) (definiti come resistenti sia a RIF che a INH) e in tali isolati ha una frequenza segnalata superiore al 95%.^{4,5,6} La resistenza a RIF o ad altri farmaci di prima linea indica generalmente la necessità di eseguire test completi di sensibilità, compresi quelli relativi ai farmaci di seconda linea.

Il rilevamento molecolare della TB e di mutazioni del gene *rpoB* associate alla resistenza a RIF riduce significativamente i tempi necessari per la diagnosi della tubercolosi sensibile ai farmaci e MDR. Con il test Xpert MTB/RIF Ultra, ciò può essere eseguito in meno di 80 minuti su campioni di espettorato non trattati e su sedimenti preparati. Un rapido rilevamento dell'MTB e della resistenza a RIF consente ai medici di prendere importanti decisioni di gestione terapeutica dei pazienti, nell'ambito di una singola visita medica.

5 Principio della procedura

I GeneXpert Instrument Systems integrano e automatizzano il trattamento dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento delle sequenze bersaglio in campioni semplici o complessi, utilizzando la PCR real time e il rilevamento dei picchi di fusione. Il sistema è composto da uno strumento, un personal computer, un lettore di codici a barre e un software già installato per l'esecuzione di analisi sui campioni dei pazienti e per la visualizzazione dei risultati. Il sistema richiede l'uso di cartucce GeneXpert monouso che contengono i reagenti PCR e ospitano il processo reattivo. Grazie alle cartucce 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*, *GeneXpert Edge System User's Guide* o *GeneXpert Infinity System Operator Manual*.

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

I primer nel test Xpert MTB/RIF Ultra amplificano una parte del gene *rpoB* contenente la regione "core" di 81 coppie di basi e tratti delle sequenze bersaglio degli elementi di inserzione *IS1081* e *IS6110* multi-copia. L'analisi di fusione eseguita con quattro sonde *rpoB* è in grado di distinguere tra la sequenza wild-type conservata e le mutazioni nella regione core associate alla resistenza a RIF. Le due sonde degli elementi di inserzione migliorano il rilevamento del complesso *Mycobacterium tuberculosis* grazie alle sequenze bersaglio degli elementi di inserzione multi-copia nella maggior parte dei ceppi di TB.

6 Reagenti e strumenti

6.1 Materiali in dotazione

I kit del test Xpert MTB/RIF Ultra contengono reagenti sufficienti per il trattamento di 10 campioni o di 50 campioni. Il contenuto dei kit è il seguente.

Cartucce Xpert MTB/RIF Ultra con provette di reazione integrate	10 per kit	50 per kit
<ul style="list-style-type: none"> ● Microsfera 1 e Microsfera 2 (liofilizzate) ● Microsfera 3 (liofilizzata) ● Reagente 1 ● Reagente 2 	2 di ciascuna per cartuccia 1 di ciascuna per cartuccia 4 ml per cartuccia 4 ml per cartuccia	2 di ciascuna per cartuccia 1 di ciascuna per cartuccia 4 ml per cartuccia 4 ml per cartuccia
Flaconi di reagente per il campione	10	50
<ul style="list-style-type: none"> ● Reagente per il campione 	8 ml per flacone	8 ml per flacone
Pipette di trasferimento monouso	12 per kit	60 per kit
CD	1 per kit	1 per kit
<ul style="list-style-type: none"> ● File di definizione del saggio (ADF) ● Istruzioni per l'importazione di ADF nel software ● Istruzioni per l'uso (package insert) 		

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 **ASSISTENZA (SUPPORT)**.

Nota L'albumina di siero bovino (BSA) presente nelle microsfere 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.

6.2 Conservazione e manipolazione

- Conservare le cartucce del test Xpert MTB/RIF Ultra a 2-28 °C.
- Aprire il coperchio della cartuccia solo immediatamente prima di eseguire il test.
- Non utilizzare i reagenti o le cartucce oltre la data di scadenza.

7 Materiali necessari ma non forniti

- GeneXpert Dx System, GeneXpert Infinity System o GeneXpert Edge System (il numero di catalogo varia a seconda della configurazione): strumento GeneXpert, computer con software proprietario GeneXpert versione 4.7b o superiore (GeneXpert Dx System), Xpertise™ versione 6.4b o superiore (GeneXpert Infinity System), software GeneXpert Edge versione 1.0 (GeneXpert Edge System), lettore di codici a barre e manuale dell'operatore.
- Stampante: Se è necessaria una stampante, rivolgersi al rappresentante commerciale di Cepheid per predisporre l'acquisto della stampante consigliata.
- Contenitori di raccolta sterili a tenuta stagna con tappo a vite
- Guanti monouso
- Etichette e/o pennarello indelebile
- Pipette sterili per il trattamento del campione

8 Avvertenze, precauzioni e pericoli chimici


8.1 Avvertenze e precauzioni

- 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 i Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie negli Stati Uniti (U.S. Centers for Disease Control and Prevention)⁷ e l'Istituto per gli standard clinici e di laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute).⁸
- Per manipolare campioni e reagenti, indossare guanti protettivi monouso, camici da laboratorio e protezione per gli occhi. Lavarsi accuratamente le mani dopo avere manipolato i campioni e i reagenti del test.
- Durante il trattamento di sostanze chimiche e la manipolazione di campioni biologici, rispettare le procedure di sicurezza previste dalla struttura sanitaria di appartenenza.
- Non sostituire i reagenti del test Xpert MTB/RIF Ultra con altri reagenti.
- Aprire il coperchio della cartuccia del test Xpert MTB/RIF Ultra soltanto per aggiungere il campione trattato.
- Non utilizzare una cartuccia caduta dopo essere stata estratta dal kit.
- Non utilizzare una cartuccia che sia caduta, sia stata agitata o il cui contenuto si sia versato dopo aver aggiunto il campione trattato. 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 con codice a barre.
- Non usare la cartuccia se appare umida o se sembra che il sigillo del coperchio sia stato rotto.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione è danneggiata.
- Quando si analizza più di un campione per volta, aprire soltanto una cartuccia, aggiungere il campione trattato con reagente e chiudere il coperchio della cartuccia prima di analizzare il campione successivo. Cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro.

- Ciascuna cartuccia del test Xpert MTB/RIF Ultra viene usata per l'esecuzione di un singolo test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Per evitare la contaminazione dei campioni di analisi o dei reagenti, seguire buone pratiche di laboratorio e cambiare i guanti per manipolare i campioni di analisi tra un paziente e l'altro. Pulire regolarmente le superfici e le aree di lavoro con candeggina al 10% e quindi passare di nuovo le superfici con etanolo o alcol isopropilico al 70% prima e dopo il trattamento dei campioni di analisi.
- 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 medici.

8.2 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 vapori 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.

Consigli di prudenza

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.

9 Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni di analisi

Raccolta dei campioni di analisi

Per la raccolta dei campioni seguire il protocollo del proprio presidio.

Raccogliere l'espettorato o l'espettorato indotto da aerosol seguendo le procedure standard del proprio presidio. Analizzare l'espettorato non trattato o il sedimento di espettorato concentrato/decontaminato. Per determinare la quantità adeguata di campione, vedere la tabella sotto.

Tabella 1. Volume di campione di analisi richiesto

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

^a Con un volume di campione uguale o maggiore di 0,7 ml per un singolo test, deve essere usato un rapporto campione:RC pari a 1:2.

Conservazione e trasporto

Espettorato sedimentato: conservare il sedimento risospeso a 2-8 °C per un massimo di sette giorni.

Espettorato non trattato: trasportare e conservare l'espettorato a 2-8 °C prima del trattamento, ogni qualvolta possibile. Se necessario, i campioni di espettorato non trattato possono essere conservati a un massimo di 35 °C per un massimo di tre giorni e poi a 2-8 °C per altri sette giorni.

10 Procedura di analisi

10.1 Procedura per sedimenti di espettorato decontaminato, concentrato

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

Requisiti di volume: con il test Xpert MTB/RIF Ultra possono essere analizzati sedimenti di espettorato preparato secondo il metodo di Kent e Kubica¹¹ e risospeso in tampone fosfato 67 mM/H₂O. Dopo la risospensione, conservare almeno 0,5 ml di sedimento risospeso per il test Xpert MTB/RIF Ultra. Per tutti i volumi inferiori a 0,7 ml eseguire i passaggi 1–6. Questi passaggi richiedono 3 parti di reagente per il campione (RC) per 1 parte di sedimento, in modo da produrre un volume adeguato (~2 ml) per le prestazioni ottimali del saggio.

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. Portare la cartuccia a temperatura ambiente. Etichettare ciascuna cartuccia del test Xpert MTB/RIF Ultra con l'ID del campione. Vedere la Figura 1.

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.

2. Miscelare il sedimento mediante vortex o usare una pipetta per aspirare ed espellere il materiale tante volte quanto basta a garantire la sospensione di tutti gli organismi.
 3. Utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire 0,5 ml dei pellet dal totale risospeso in una provetta conica con tappo a vite per il test Xpert MTB/RIF Ultra.
-

Nota I sedimenti risospesi non immediatamente analizzati devono essere conservati a 2–8 °C. Non eseguire il test Xpert MTB/RIF Ultra su un sedimento risospeso che sia stato refrigerato per > 7 giorni.

4. Utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire 1,5 ml di reagente per il campione (RC) Xpert MTB/RIF Ultra in 0,5 ml di sedimento risospeso. Chiudere bene il tappo.
 5. Scuotere vigorosamente per 10-20 volte o miscelare in vortex per almeno 10 secondi.
-

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

6. 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.
 7. Lasciare il campione in incubazione a temperatura ambiente per altri 5 minuti.
-

10.2 Procedura per espettorato non trattato

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

1. Portare la cartuccia a temperatura ambiente. Etichettare ciascuna cartuccia del test Xpert MTB/RIF Ultra con l'ID del campione. Vedere la Figura 1.
-

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.



Figura 1. Annotazione sulla cartuccia con un pennarello indelebile

2. Dopo aver ricevuto il campione in un contenitore di raccolta di espettorato a tenuta stagna, aprire con cautela il coperchio del contenitore di raccolta ed esaminare il contenuto per verificare che non siano presenti particelle di cibo o altre particelle solide.
-

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



Figura 2. Apertura del contenitore del campione

3. Versare nell'espettorato circa 2 volte il volume di RC (diluizione RC:espettorato = 2:1).

Nota Scartare l'RC avanzato e il flacone in un contenitore per rifiuti chimici.



Figura 3. Esempio di diluizione 2:1 (8 ml di SR:4 ml di espettorato)



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

4. Riposizionare e fissare il coperchio. Scuotere vigorosamente per 10-20 volte o miscelare 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.
6. Scuotere vigorosamente il campione di analisi per 10-20 volte o agitare in vortex per almeno 10 secondi. Lasciare il campione in incubazione a temperatura ambiente per altri 5 minuti.

Nota Verificare che il campione di analisi si sia liquefatto completamente; in caso contrario, ripetere questo passaggio.

10.3 Preparazione della cartuccia

Nota Quando si utilizza GeneXpert Dx System o GeneXpert Edge System, iniziare il test entro 4 ore dall'introduzione del campione nella cartuccia. Dopo l'aggiunta del campione alla cartuccia, quest'ultima deve rimanere a temperatura ambiente fino all'avvio del test, entro quattro ore. Se si utilizza GeneXpert Infinity System, accertarsi di avviare il test e mettere la cartuccia sul trasportatore entro 30 minuti dall'aggiunta del campione trattato con reagente alla cartuccia. Il software Xpertise tiene traccia del periodo di stabilità rimanente, in modo che i test vengano eseguiti prima della scadenza a bordo di 4 ore.

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



Figura 5. Aspirazione fino alla tacca sulla pipetta

3. Trasferire il campione nell'apposita camera della cartuccia Xpert MTB/RIF Ultra. Dispensare il campione lentamente in modo da contenere il rischio di formazione di aerosol. Vedere la Figura 6.



Figura 6. Dispensazione del campione liquefatto decontaminato nella camera della cartuccia per il campione

4. Chiudere bene il coperchio della cartuccia. Nel caso in cui fosse necessario rieseguire il test, il campione liquefatto rimanente può essere conservato per massimo 4 ore a 2–8 °C.

11 Esecuzione del test

- Per GeneXpert Dx System, vedere la Sezione 11.1.
- Per GeneXpert Edge System, vedere la Sezione 11.2.
- Per GeneXpert Infinity System, vedere la Sezione 11.3.

11.1 GeneXpert Dx System

11.1.1 Avvio del test

Prima di iniziare il test, assicurarsi che:

- Importante**
- il sistema stia eseguendo la versione corretta del software GeneXpert Dx mostrata nella sezione Materiali necessari ma non forniti;
 - nel software sia stato importato il file di definizione del saggio corretto.

In questa sezione sono elencati i passaggi principali di esecuzione del test. Per le istruzioni dettagliate, vedere la *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

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

1. Accendere GeneXpert Dx System, poi il computer ed effettuare l'accesso. Il software GeneXpert si avvia automaticamente. Se ciò non dovesse accadere, fare doppio clic sull'icona del collegamento del software GeneXpert Dx sul desktop di Windows®.
2. Effettuare l'accesso con il proprio nome utente e la password.
3. Nella finestra del **sistema GeneXpert**, fare clic su **Crea analisi (Create Test)**. Viene visualizzata la finestra **Crea analisi (Create Test)**. Si aprirà la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre dell'ID paziente (Scan Patient ID Barcode)**.
4. Eseguire la scansione dell'ID paziente (Patient ID) o digitarlo. Se l'ID paziente (Patient ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente.
L'ID paziente (Patient ID) è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** e in tutti i rapporti. Verrà visualizzata la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre dell'ID campione (Scan Sample ID Barcode)**.
5. Inserire l'ID campione (Sample ID) tramite scansione o manualmente. Se l'ID campione (Sample ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente.
L'ID del campione sarà associato ai risultati del test e viene mostrato nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** e su tutti i rapporti. Si aprirà la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre della cartuccia (Scan Cartridge Barcode)**.
6. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia. Utilizzando le informazioni contenute nel codice a barre, il software compila automaticamente le caselle relative ai seguenti campi: Seleziona saggio (Select Assay), ID lotto reagente (Reagent Lot ID), N/S cartuccia (Cartridge S/N) e Data di scadenza (Expiration Date).

Nota Se non si riesce a eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia, ripetere il test con una cartuccia nuova. Se è stata eseguita la scansione del codice a barre della cartuccia nel software e il file di definizione del saggio non è disponibile, apparirà una schermata in cui si indica che il file di definizione del saggio non è stato caricato nel sistema. Se compare tale schermata, contattare il Supporto Tecnico di Cepheid.

7. Fare clic su **Avvia analisi (Start Test)**. Se richiesto, digitare la propria password nella finestra di dialogo visualizzata.
8. Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
9. Chiudere lo sportello. Il test viene avviato e la spia verde smette di lampeggiare.
Al termine del test, la spia si spegne.
10. Attendere che il sistema abbia sbloccato lo sportello del modulo prima di aprirlo, quindi rimuovere la cartuccia.
11. Smaltire le cartucce usate negli appositi contenitori dei rifiuti di campioni di analisi attenendosi alla prassi standard del proprio presidio.

11.1.2 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 sulla visualizzazione e la stampa dei risultati, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx*.

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.

11.2 GeneXpert Edge System

(può non essere disponibile in alcuni Paesi).

11.2.1 Avvio di un nuovo test

È possibile avviare un test supplementare mentre il primo è in corso.

1. Toccare il pulsante **PAGINA INIZIALE (HOME)**.
La schermata **Pagina iniziale (Home)** mostrerà il modulo in uso leggermente grigio e l'indicazione che la raccolta dei dati è in corso.
2. Toccare il pulsante **ESEGUI NUOVO TEST (RUN NEW TEST)** e procedere con il nuovo test seguendo i passaggi riportati nella Avvio del test.
3. Mentre il secondo test è in corso, toccare il pulsante **PAGINA INIZIALE (HOME)**.
Comparirà lo stato di entrambi i test. Al termine del test, il testo dell'icona diventerà **Raccolta dati completata (Data collection complete)** e mostrerà un segno di spunta sull'icona.
4. Toccare l'icona **Raccolta dati completata (Data collection complete)** per visualizzare la schermata **Rimuovi cartuccia (Remove Cartridge)**. Seguire le istruzioni che appaiono sullo schermo per rimuovere la cartuccia.

11.2.2 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 sulla visualizzazione e la stampa dei risultati, consultare il *GeneXpert Edge System User's Guide*.

Nota Se per la refertazione dei risultati si utilizza un sistema LIS, confermare che i risultati del LIS coincidano con quelli del sistema per l'ID del paziente; in presenza di conflitti, refertare solo i risultati del sistema.

1. Toccare il pulsante **VISUALIZZA TEST PRECEDENTI (VIEW PREVIOUS TESTS)** nella schermata **Pagina iniziale (Home)**.
2. Nella schermata **Seleziona analisi (Select Test)**, selezionare il test toccandone il nome o utilizzando le frecce per selezionarlo.

11.3 GeneXpert Infinity System

11.3.1 Avvio del test

Prima di iniziare il test, assicurarsi che:

- Importante**
- il sistema stia eseguendo la versione corretta del software Xpertise mostrata nella sezione Materiali necessari ma non forniti;
 - nel software sia stato importato il file di definizione del saggio corretto.

In questa sezione sono elencati i passaggi principali di esecuzione del test. Per le istruzioni dettagliate, vedere la *GeneXpert Infinity System Operator Manual*.

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

1. Accendere lo strumento. Il software Xpertise si avvia automaticamente. Se non si avvia, fare doppio clic sull'icona del collegamento del software Xpertise sul desktop di Windows®.
2. Effettuare l'accesso nel computer, quindi al software del sistema GeneXpert Xpertise con il proprio nome utente e la password.

3. Nell'area di lavoro della **Pagina iniziale Xpertise Software (Xpertise Software Home)**, fare clic su **Ordini (Orders)** e nell'area di lavoro **Ordini (Orders)** fare clic su **Ordina test (Order Test)**. Viene visualizzata l'area di lavoro **Ordina test - ID paziente (Order Test – Patient ID)**.
4. Eseguire la scansione dell'ID paziente (Patient ID) o digitarlo. Se l'ID paziente (Patient ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID paziente (Patient ID) è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** e in tutti i rapporti.
5. Immettere le ulteriori informazioni richieste dalla propria organizzazione e fare clic sul pulsante **CONTINUA (CONTINUE)**. Viene visualizzata l'area di lavoro **Ordina test - ID campione (Order Test - Sample ID)**.
6. Inserire l'ID campione (Sample ID) tramite scansione o manualmente. Se l'ID campione (Sample ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID del campione sarà associato ai risultati del test e viene mostrato nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** e su tutti i rapporti.
7. Fare clic sul pulsante **CONTINUA (CONTINUE)**. Viene visualizzata l'area di lavoro **Ordina test - Saggio (Order Test - Assay)**.
8. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia. Utilizzando le informazioni contenute nel codice a barre, il software compila automaticamente le caselle relative ai seguenti campi: Seleziona saggio (Select Assay), ID lotto reagente (Reagent Lot ID), N/S cartuccia (Cartridge S/N) e Data di scadenza (Expiration Date).

Nota

Se non si riesce a eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia, ripetere il test con una cartuccia nuova. Se è stata eseguita la scansione del codice a barre della cartuccia nel software e il file di definizione del saggio non è disponibile, apparirà una schermata in cui si indica che il file di definizione del saggio non è stato caricato nel sistema. Se compare tale schermata, contattare il Supporto Tecnico di Cepheid.

Dopo la scansione della cartuccia, viene visualizzata l'area di lavoro **Ordina test - Informazioni sul test (Order Test - Test Information)**.

9. Verificare che le informazioni siano corrette e fare clic su **Invia (Submit)**. Se richiesto, digitare la propria password nella finestra di dialogo visualizzata.
10. Posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore. La cartuccia viene caricata automaticamente, il test viene eseguito e la cartuccia usata viene collocata nel contenitore dei rifiuti.

11.3.2 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 sulla visualizzazione e la stampa dei risultati, consultare il *GeneXpert Infinity System Operator Manual*.

1. Nell'area di lavoro della **pagina iniziale del software Xpertise**, premere l'icona **RISULTATI (RESULTS)**. Viene visualizzato il menu Risultati (Results).
2. Nel menu Risultati (Results), premere il pulsante **VISUALIZZA RISULTATI (VIEW RESULTS)**. L'area di lavoro **Visualizza risultati (View Results)** mostra i risultati del test.
3. Fare clic sul pulsante **RAPPORTO (REPORT)** per visualizzare e/o generare un file del rapporto in formato PDF.

12 Controllo qualità

Ciascun test comprende un controllo per il trattamento dei campioni (SPC) e un controllo per la verifica della sonda (PCC).

Controllo per il trattamento dei campioni (SPC)

Assicura che il campione sia stato trattato correttamente. Il controllo SPC contiene spore non infettive, presenti in ogni cartuccia sotto forma di pellet di spore essiccate, per verificare il corretto trattamento dell'MTB. L'SPC verifica che sia avvenuta la lisi dell'MTB in presenza degli organismi e verifica l'adeguatezza dell'analisi del campione. Inoltre, questo controllo rileva l'inibizione del saggio di PCR real time associata al campione di analisi.

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. Il risultato del test è "Non valido" (Invalid) se l'SPC non viene rilevato in un test negativo.

Controllo per la verifica della sonda (PCC)

Prima che inizi la reazione PCR, il test Xpert MTB/RIF Ultra misura il segnale di fluorescenza emesso dalle sonde, allo scopo di monitorare la reidratazione delle microsfere, 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.

13 Interpretazione dei risultati

Il sistema di strumentazione GeneXpert genera i risultati dai segnali fluorescenti misurati e da algoritmi di calcolo incorporati. I risultati vengono presentati nella finestra **Visualizza risultati (View Results)**. Vedere la Figura 7, Figura 8, Figura 9, Figura 10, Figura 11 e la Figura 12 per esempi specifici e la Tabella 3 per un elenco di tutti i possibili risultati.

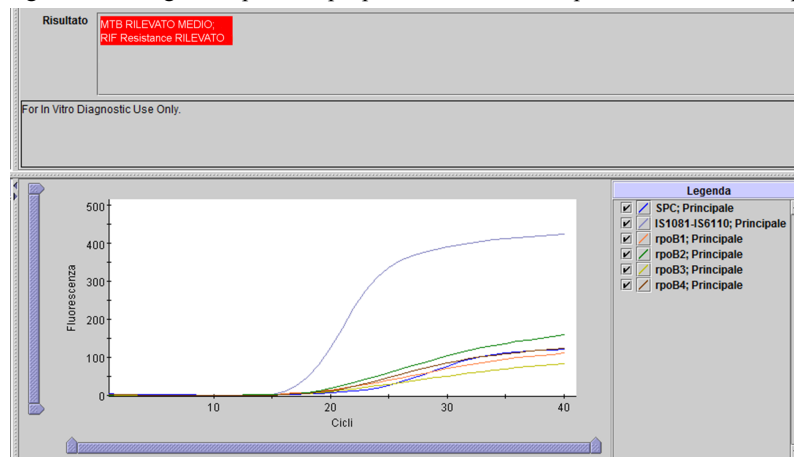


Figura 7. RILEVATO MTB MEDIO (MTB DETECTED MEDIUM); RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED) (GeneXpert Dx, vista utente dettagliata)

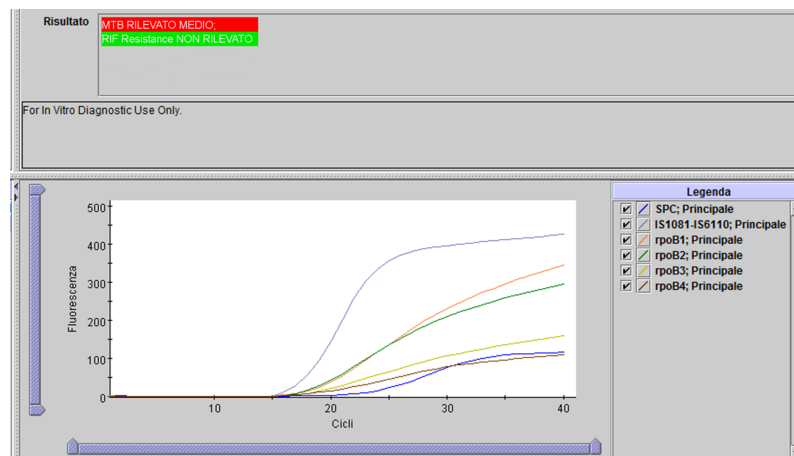


Figura 8. RILEVATO MTB MEDIO (MTB DETECTED MEDIUM); NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED) (GeneXpert Dx, vista utente dettagliata)

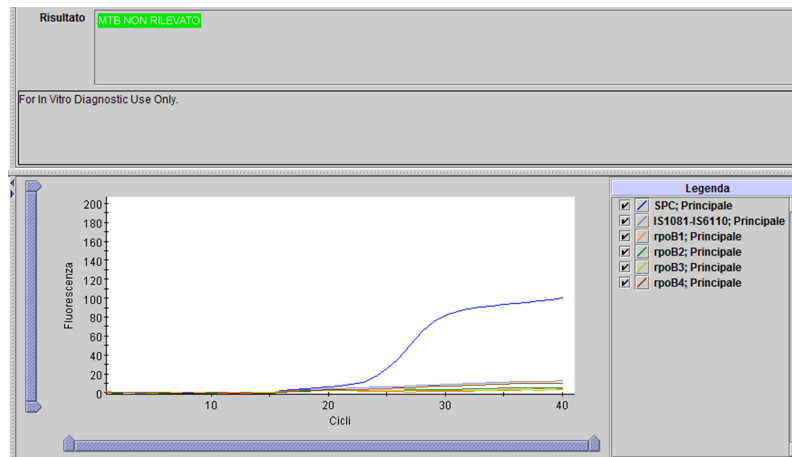


Figura 9. MTB NON RILEVATO (MTB NOT DETECTED) (GeneXpert Dx, vista utente dettagliata)

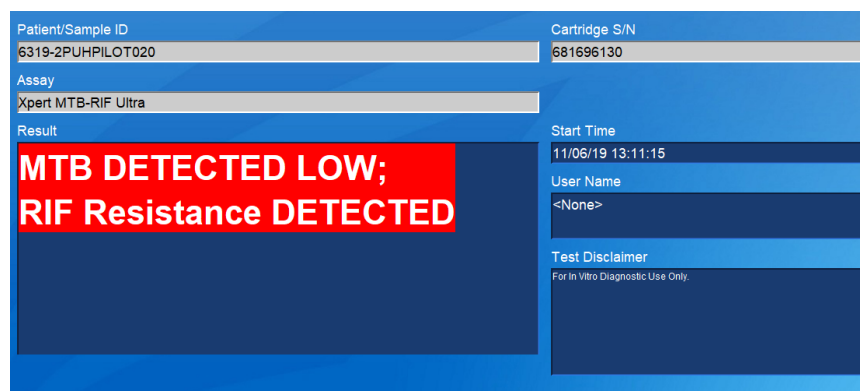


Figura 10. RILEVATO MTB BASSO (MTB DETECTED LOW); RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED) (GeneXpert Edge)

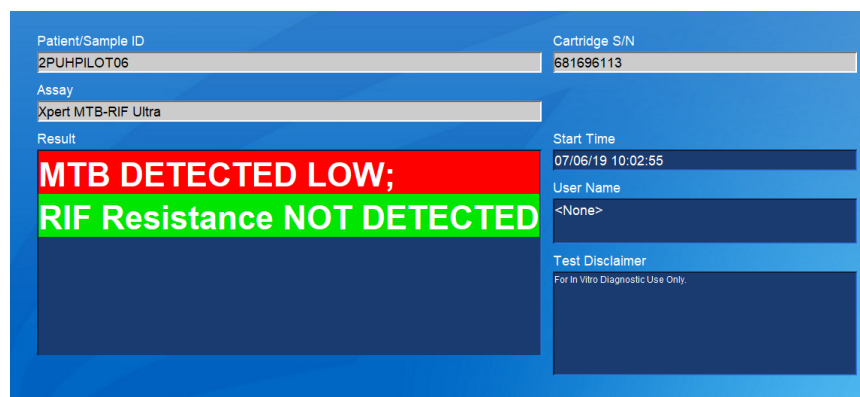


Figura 11. RILEVATO MTB BASSO (MTB DETECTED LOW); NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED) (GeneXpert Edge)

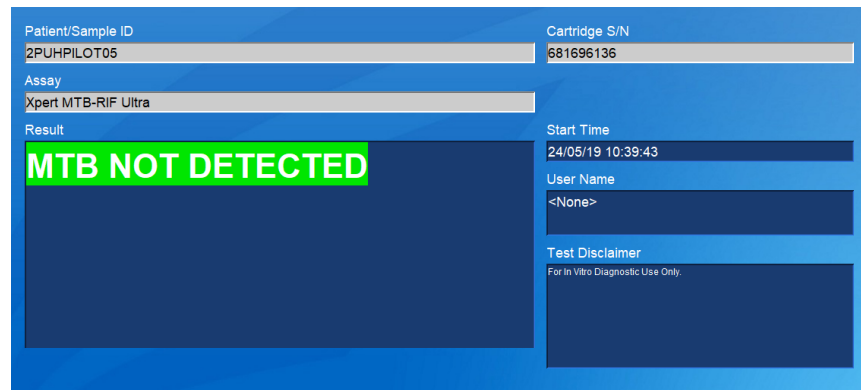


Figura 12. MTB NON RILEVATO (MTB NOT DETECTED) (GeneXpert Edge)

Tabella 2. Risultati e interpretazione del test Xpert MTB/RIF Ultra

Risultato	Interpretazione
RILEVATO MTB ALTO (MTB DETECTED HIGH); RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED)	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> È stata rilevata una mutazione nella sequenza bersaglio del gene <i>rpoB</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.
RILEVATO MTB MEDIO (MTB DETECTED MEDIUM); RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED)	
RILEVATO MTB BASSO (MTB DETECTED LOW); RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED)	
RILEVATO MTB MOLTO BASSO (MTB DETECTED VERY LOW); RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED)	
RILEVATO MTB ALTO (MTB DETECTED HIGH); NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED)	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> Non è stata rilevata alcuna mutazione nella sequenza bersaglio del gene <i>rpoB</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.
RILEVATO MTB MEDIO (MTB DETECTED MEDIUM); NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED)	
RILEVATO MTB BASSO (MTB DETECTED LOW); NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED)	

Risultato	Interpretazione
RILEVATO MTB MOLTO BASSO (MTB DETECTED VERY LOW); NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED)	
RILEVATO MTB ALTO (MTB DETECTED HIGH); Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> • È impossibile determinare la resistenza a RIF a causa del rilevamento di picchi di fusione non validi. • 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.
RILEVATO MTB MEDIO (MTB DETECTED MEDIUM); Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)	
RILEVATO MTB BASSO (MTB DETECTED LOW); Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)	
RILEVATO MTB MOLTO BASSO (MTB DETECTED VERY LOW); Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)	
RILEVATA traccia di MTB (MTB Trace DETECTED); Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)	<p>Nel campione è presente il bersaglio MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> • È impossibile determinare la resistenza a RIF a causa di un rilevamento del segnale insufficiente. • 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 RILEVATO (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 di questo documento intitolata Procedura di ripetizione del test.</p> <ul style="list-style-type: none"> • MTB NON VALIDO (MTB 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 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 di questo documento intitolata Procedura di ripetizione del test.</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. <p>Nota Se la verifica della sonda ha avuto esito positivo, l'errore è dovuto a un guasto di un componente del sistema.</p>
NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	<p>Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di MTB. Ripetere l'analisi. Vedere la sezione di questo documento intitolata Procedura di ripetizione del test. 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)

Tabella 3. Xpert MTB/RIF Ultra: Tutti i risultati possibili

Risultati TB	Risultati RIF
RILEVATO MTB ALTO (MTB DETECTED HIGH)	RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED)
RILEVATO MTB ALTO (MTB DETECTED HIGH)	NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED)
RILEVATO MTB ALTO (MTB DETECTED HIGH)	Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)
RILEVATO MTB MEDIO (MTB DETECTED MEDIUM)	RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED)
RILEVATO MTB MEDIO (MTB DETECTED MEDIUM)	NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED)
RILEVATO MTB MEDIO (MTB DETECTED MEDIUM)	Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)
RILEVATO MTB BASSO (MTB DETECTED LOW)	RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED)
RILEVATO MTB BASSO (MTB DETECTED LOW)	NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED)
RILEVATO MTB BASSO (MTB DETECTED LOW)	Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)
RILEVATO MTB MOLTO BASSO (MTB DETECTED VERY LOW)	RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED)
RILEVATO MTB MOLTO BASSO (MTB DETECTED VERY LOW)	NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED)
RILEVATO MTB MOLTO BASSO (MTB DETECTED VERY LOW)	Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)
RILEVATA traccia MTB (MTB Trace DETECTED) ^a RILEVATO (DETECTED)	Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)

Risultati TB	Risultati RIF
MTB NON RILEVATO (MTB NOT DETECTED)	
NON VALIDO (INVALID)	
ERRORE (ERROR)	
NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	

^a Un risultato Traccia significa che sono stati rilevati livelli bassi di MTB ma non è stato rilevato un risultato di resistenza a RIF. Ciò accade a causa della maggiore sensibilità del rilevamento della TB utilizzando bersagli di IS6110 e IS1081 multi-copia rispetto al rilevamento della resistenza a RIF utilizzando il gene rpoB a copia singola. Pertanto, in un campione con traccia non è possibile determinare un risultato di resistenza o sensibilità a RIF. Il campione con traccia è sempre **Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)**.

13.1 Motivi per ripetere il saggio

Il test va ripetuto con una nuova cartuccia quando si verifica uno dei risultati seguenti.

- Un risultato **NON VALIDO (INVALID)** indica che l'SPC non è stato superato. Il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita.
- Un risultato **ERRORE (ERROR)** indica che il controllo per la verifica della sonda non è stato superato e il saggio è stato interrotto, probabilmente a causa del riempimento inadeguato della provetta di reazione; che è stato individuato un problema a livello di integrità della sonda perché sono stati superati i limiti massimi di pressione; che è presente un errore del modulo GeneXpert.
- **NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** indica che i dati raccolti sono insufficienti. Ad esempio, l'operatore ha interrotto un test in corso.

13.2 Procedura di ripetizione del test

Se si dispone di un avanzo di espettorato fresco o di sedimento ricostituito, usare sempre reagente del campione (RC) nuovo per decontaminare e liquefare l'espettorato o il sedimento prima di eseguire il saggio. Vedere Sezione 10 o Procedura per espettorato non trattato.

Se l'avanzo di campione trattato con RC è sufficiente e non sono ancora trascorse 4 ore dall'aggiunta iniziale di RC al campione, si può usare il campione avanzato per preparare e trattare una nuova cartuccia. Per la ripetizione dell'esame usare sempre una cartuccia nuova e avviare l'analisi immediatamente. Vedere la Sezione 10.3.

14 Limitazioni

Il rilevamento dell'MTB dipende dal numero di organismi presenti nel campione, pertanto l'affidabilità dei risultati dipende dalla correttezza della raccolta, manipolazione e conservazione del campione. Risultati errati dell'analisi potrebbero verificarsi a causa di errori di raccolta, manipolazione o conservazione del campione, errori tecnici, scambio di campioni o materiale di partenza in concentrazione insufficiente. La stretta osservanza delle Istruzioni per l'uso è necessaria per evitare risultati erranei.

In alcuni casi, per i soggetti con risultati **RILEVATA traccia di MTB (MTB Trace DETECTED)**, prima di prendere decisioni riguardanti il trattamento della TB potrebbe essere necessario acquisire ulteriori dati clinici da inserire nel contesto clinico.

Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di microrganismi vitali. Tale risultato è tuttavia indicativo della presenza di MTB e di resistenza alla rifampicina.

Eventuali mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o delle sonde potrebbero influire sul rilevamento di ceppi di MTB multiresistenti (MDR) o resistenti alla rifampicina nuovi o non noti, con un conseguente falso risultato di sensibilità alla rifampicina.

Le prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra non sono state valutate in pazienti di età inferiore a diciotto anni.

Il test Xpert MTB/RIF Ultra non fornisce conferma della sensibilità alla rifampicina poiché è possibile che esistano meccanismi di resistenza alla rifampicina differenti da quelli rilevati da questo dispositivo e che siano associati alla mancanza di risposta clinica al trattamento.

I campioni di analisi con DNA del complesso MTB (MTB-complex DNA) e le mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina del gene *rpoB* rilevati dal test Xpert MTB/RIF Ultra devono essere considerati per ulteriori test di farmaco sensibilità.

Le prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra dipendono dalla competenza dell'operatore e dall'adesione alle procedure del saggio. Errori nella procedura del saggio possono generare risultati falsi positivi o falsi negativi. Tutti gli operatori del dispositivo devono avere acquisito una formazione adeguata sul dispositivo.

15 Prestazioni cliniche

15.1 Disegno dello studio clinico

Le caratteristiche prestazionali del test Xpert MTB/RIF Ultra sono state valutate rispettivamente per il rilevamento del DNA del complesso MTB e per il rilevamento delle mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina nei campioni di espettorato rispetto ai risultati da coltura (terreni solidi e/o liquidi) e ai test di farmaco sensibilità (DST). Questo studio multicentrico ha utilizzato campioni di espettorato prospettici e archiviati direttamente (raw) o di sedimenti concentrati raccolti da soggetti di 18 anni o di età maggiore. I soggetti includevano sospetti di TB polmonare che non avevano ricevuto un trattamento anti TB o con meno di 3 giorni di trattamento entro 6 mesi dall'inizio dello studio (pazienti sospetti di TB) ed anche soggetti precedentemente sottoposti a trattamento anti TB sospetti di TB multi-resistente ai farmaci (sospetti di TB MDR). Lo studio è stato condotto in tutto il mondo (Bielorussia, Brasile, Cina, Georgia, Germania, India, Italia, Kenya, Perù, Sud Africa, Uganda, Vietnam e Stati Uniti). La sensibilità e la specificità del test Xpert MTB/RIF Ultra per il rilevamento di MTB sono state valutate utilizzando dati provenienti esclusivamente da pazienti sospetti di TB; mentre i dati provenienti da pazienti sospetti di TB MDR sono stati combinati per valutare le prestazioni della resistenza a RIF.

I campioni provenivano da soggetti di studio di cui il 61% maschi (n=1111), il 35% femmine (n=648); per il 4% (n=76) non si conosceva il sesso. Provenivano da regioni geograficamente diverse: 12% (n=217) da Stati Uniti (California, New York e Florida) e 88% (n=1618) da Paesi al di fuori degli Stati Uniti (Bielorussia, Brasile, Cina, Georgia, Germania, Italia, India, Kenya, Sud Africa, Perù, Vietnam e Uganda). Dei 1835 campioni di analisi, 1228 erano stati raccolti in modo prospettico e 607 provenivano da banche di archivio di campioni congelati.

15.2 Confronto delle prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra e della coltura MTB

Fino a tre campioni di espettorato sono stati raccolti da ciascun soggetto dello studio per l'uso nello studio clinico. Per i campioni di analisi prospettici, il primo campione di espettorato è stato analizzato con il test Xpert MTB/RIF Ultra e gli altri due campioni sono stati utilizzati per la coltura TB. Per i campioni archiviati, i risultati della coltura sono stati disponibili grazie al metodo di trattamento standard e il test Xpert MTB/RIF Ultra è stato eseguito usando il primo campione di analisi dotato di volume sufficiente. Se il risultato del saggio era indeterminato (**ERRORE (ERROR), NON VALIDO (INVALID) o NESSUN RISULTATO (NO RESULT)**) e il volume era sufficiente, il campione veniva rianalizzato. Complessivamente, l'1,0% dei campioni testati proveniente da soggetti idonei (19/1854; IC al 95%: 0,7, 1,6) sono risultati non determinati. Lo stato dello striscio per bacilli acido-resistenti (AFB) di un soggetto è stato determinato con auramina-O (AO) fluorescente o con colorazione dello striscio di Ziehl-Neelsen (ZN) da campioni di analisi con il risultato del test Xpert MTB/RIF Ultra corrispondente. Lo stato della coltura MTB per tutti i soggetti veniva definito sulla base del risultato della coltura MTB di tutti i campioni di analisi raccolti per quel soggetto in un periodo di tempo di 7 giorni.

Nella tabella sottostante sono illustrate le prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra per quanto riguarda il rilevamento di MTB rispetto alla coltura MTB, stratificate in base allo stato dello striscio per AFB. La sensibilità nei campioni con striscio positivo e striscio negativo è stata rispettivamente del 99,5% (426/428), IC al 95%: 98,3, 99,9 e 73,3% (200/273), IC al 95%: 67,7, 78,2. La specificità complessiva del test Xpert MTB/RIF Ultra indipendentemente dallo striscio AFB è stata del 95,5% (1222/1280) IC al 95%: 94,2, 96,5. Vedere la tabella sotto.

Tabella 4. Confronto delle prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra e della coltura MTB

		Striscio/Coltura				Totale
		Positivi			Negativi	
		Striscio AFB +	Striscio AFB -	Coltura complessiva +	Coltura complessiva -	
Xpert MTB/ RIF Ultra	MTB RILEVATO (MTB DETECTED)	426	200	630 ^a	58	688
	MTB NON RILEVATO (MTB NOT DETECTED)	2	73	75	1222	1297
	Totale	428	273	705	1280	1985
Prestazioni nello striscio positivo: Sensibilità: 99,5% (426/428), IC al 95%: 98,3, 99,9 Prestazioni nello striscio negativo: Sensibilità: 73,3% (200/273), IC al 95%: 67,7, 78,2 Prestazioni complessive: Sensibilità: 89,4% (630/705), IC al 95%: 86,9, 91,4 Specificità: 95,5% (1222/1280), IC al 95%: 94,2, 96,5						

^a I risultati dello striscio non erano disponibili per 4 campioni di analisi positivi della coltura.

Le prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra per il rilevamento di MTB rispetto alla coltura MTB, stratificate per centri al di fuori degli Stati Uniti e centri negli Stati Uniti sono mostrate nella tabella sotto. Tra 1985 campioni di analisi, vi erano 1768 campioni provenienti da centri al di fuori degli Stati Uniti e 217 da centri negli Stati Uniti.

Tabella 5. Confronto fra il test Xpert MTB/RIF Ultra e la coltura MTB per centri al di fuori degli Stati Uniti e centri negli Stati Uniti

	Non-USA		USA	
	N	Percentuale (IC al 95%)	N	Percentuale (IC al 95%)
Striscio sensibilità positivo	380/382	99,5% (98,1, 99,9)	46/46	100,0% (92,3, 100)
Striscio sensibilità negativo	180/245	73,5% (67,6, 78,6)	20/28	71,4% (52,9, 84,7)
Sensibilità complessiva	564/631 ^a	89,4% (86,7, 91,6)	66/74	89,2% (80,1, 94,4)
Specificità complessiva	1080/1137	95,0% (93,6, 96,1)	142/143	99,3% (96,1, 99,9)

^a I risultati dello striscio non erano disponibili per 4 campioni di analisi positivi della coltura.

15.3 Confronto delle prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra e della coltura per tipo di striscio

Le prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra per il rilevamento di MTB sono state determinate rispetto alla coltura MTB nei campioni di analisi con striscio AFB eseguito mediante AO e ZN. I risultati sono riportati nella tabella sotto. Tra 1985 campioni di analisi, vi erano 1810 campioni con strisci AO e 175 con strisci ZN.

Tabella 6. Confronto delle prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra e della coltura MTB mediante i metodi di colorazione con auramina O (AO) e di Ziehl-Neelsen (ZN)

	Metodo con auramina O		Metodo di Ziehl-Neelsen	
	N	Percentuale (IC al 95%)	N	Percentuale (IC al 95%)
Striscio sensibilità positivo	386/388	99,5% (98,1, 99,9)	40/40	100% (91,2, 100)
Striscio sensibilità negativo	153/219	69,9% (63,5, 75,6)	47/54	87,0% (75,6, 93,6)
Sensibilità complessiva	543/611 ^a	88,9% (86,1, 91,1)	87/94	92,6% (85,4, 96,3)
Specificità complessiva	1145/1199	95,5% (94,2, 96,5)	77/81	95,1% (88,0, 98,1)

^a I risultati dello striscio non erano disponibili per 4 campioni di analisi positivi della coltura.

15.4 Confronto delle prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra e della coltura per tipo di campione di analisi

Le prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra per il rilevamento dell'MTB sono state determinate rispetto alla coltura MTB in campioni di espettorato non trattato e sedimento di espettorato concentrato. I risultati sono riportati nella tabella sotto. Dei 1985 campioni, 1543 erano campioni di espettorato non trattato e 442 campioni di sedimento di espettorato concentrato.

Tabella 7. Confronto delle prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra e della coltura MTB per tipo di campione di analisi

	Espettorato diretto		Sedimenti di espettorato	
	N	% (IC al 95%)	N	% (IC al 95%)
Striscio sensibilità positivo	323/324	99,7% (98,3, 99,9)	103/104	99,0% (94,8, 99,8)
Striscio sensibilità negativo	168/229	73,4% (67,3, 78,7)	32/44	72,7% (58,2, 83,7)
Sensibilità complessiva	495/557 ^a	88,9% (86,0, 91,2)	135/148	91,2% (85,6, 94,8)

	Espettorato diretto		Sedimenti di espettorato	
	N	% (IC al 95%)	N	% (IC al 95%)
Specificità complessiva	937/986	95,0% (93,5, 96,2)	285/294	96,9% (94,3, 98,4)

^a I risultati dello striscio non erano disponibili per 4 campioni di analisi positivi della coltura.

15.5 Confronto delle prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra e del test di farmaco sensibilità per RIF

Gli isolati di coltura positivi per MTB sono stati analizzati per la farmaco sensibilità (DST) per la rifampicina, utilizzando le metodiche delle proporzioni di agar con terreno di coltura Middlebrook o Lowenstein-Jensen, la piastra MIC Thermo Scientific Sensititre™ Mycobacterium tuberculosis o il saggio BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE. Le prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra per il rilevamento delle mutazioni associate alla resistenza a RIF sono state determinate rispetto ai risultati DST degli isolati da coltura MTB.

I risultati per il rilevamento delle mutazioni associate alla resistenza a RIF sono segnalati dal test Xpert MTB/RIF Ultra solo quando il dispositivo aveva rilevato la sequenza del gene *rpoB* del complesso MTB. Le prestazioni della sensibilità/resistenza a RIF sono state riportate nella tabella sotto. I campioni di analisi con DST non eseguito, **MTB NON RILEVATO (MTB NOT DETECTED)** e **MTB RILEVATO (MTB DETECTED)**; **Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)** sono stati esclusi dall'analisi. 63 su 67 campioni di analisi con risultati RIF indeterminati sono risultati **RILEVATA Traccia di MTB (MTB Trace DETECTED)**; **Resistenza a RIF INDETERMINATA (RIF Resistance INDETERMINATE)**.

Tabella 8. Confronto delle prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra e DST

Test di farmaco sensibilità				
		Resistenza a RIF	Sensibilità a RIF	Totale
Xpert MTB/ RIF Ultra	MTB RILEVATO (MTB DETECTED), RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance DETECTED)	128	12 ^a	140
	MTB RILEVATO (MTB DETECTED), NON RILEVATA resistenza a RIF (RIF Resistance NOT DETECTED)	5 ^b	314	319
	Totale	133	326	459
		Sensibilità: 96,2% (128/133), IC al 95%: 91,5, 98,4 Specificità: 96,3% (314/326), IC al 95%: 93,7, 97,9		

^a Risultati sequenziamento discordanti: 11 su 12 resistenti a RIF, 1 su 12 non disponibile.

^b Risultati sequenziamento discordanti: 4 su 5 sensibili a RIF, 1 su 5 non disponibile.

15.6 Confronto delle prestazioni del test Xpert MTB/RIF Ultra e del saggio Xpert MTB/RIF

1594 campioni di analisi sono stati analizzati tramite il test Xpert MTB/RIF Ultra e il saggio Xpert MTB/RIF. La percentuale di concordanza complessiva tra i saggi è stata del 96,5% [(1538/1594) IC al 95%: 95,5, 97,3]. La percentuale di concordanza positiva e la percentuale di concordanza negativa sono stati rispettivamente 99,2% [(491/495) IC al 95%: 97,9, 99,7] e 95,3% [(1047/1099) IC al 95%: 93,8, 96,4].

15.7 Riproducibilità

La riproducibilità del test Xpert MTB/RIF Ultra è stata valutata presso tre centri utilizzando un pannello di campioni di analisi comprendenti ceppi di MTB con suscettibilità e resistenza alla rifampicina. I campioni di analisi positivi per MTB sono stati preparati in matrice di espettorato simulata a concentrazioni bassa (~1X LoD) e moderata (2-3X LoD). Era stato incluso anche un elemento negativo del pannello costituito da matrice di espettorato simulata. Il pannello di cinque campioni è stato testato in sei giorni diversi da due operatori diversi due volte al giorno in ciascuno dei tre centri (240 test in ciascun centro = 2 operatori x 6 giorni x 2 replicati x 2 sessioni al giorno). Nello studio sono stati utilizzati tre lotti di kit di reagenti di test Xpert MTB/RIF Ultra. La percentuale di concordanza per ciascun elemento del pannello è riportata nella Tabella 9 per centro.

Tabella 9. Sommario dei risultati di riproducibilità – Concordanza per centro dello studio/strumento

Campione	Centro 1 (GeneXpert Dx)	Centro 2 (GeneXpert Dx)	Centro 3 (Infinity-90)	% concordanza totale per campione
Negativo	98% (47/48)	100% (48/48)	100% (48/48)	99,3% (143/144)
Positività bassa per MTB, Resistenza a RIF	96% (46/48)	96% (46/48)	98% (47/48)	96,5% (139/144)
Positività moderata per MTB, Resistenza a RIF	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (144/144)
Positività bassa per MTB, Sensibilità a RIF	100% (48/48)	100% (48/48)	98% (47/48)	99,3% (143/144)
Positività moderata per MTB, Sensibilità a RIF	100% (47/47)	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (143/143)

La riproducibilità del test Xpert MTB/RIF Ultra è stata inoltre valutata in termini di segnale di fluorescenza espresso in valori di ciclo soglia (cycle threshold, Ct) per ciascun bersaglio rilevato. La media, la deviazione standard (standard deviation, DS) e il coefficiente di variazione (coefficient of variation, CV) tra i centri, tra i giorni, tra gli operatori e entro la sessione per ciascun elemento del pannello sono riportati nella Tabella 10. Per sessione si intende l'analisi di quattro campioni per ciascun elemento del pannello eseguita da un operatore presso un centro in un giorno.

16 Caratteristiche prestazionali analitiche

Tabella 10. Riepilogo dei dati di riproducibilità

Campione	N	Ct medio	Varianza												
			Tra i centri		Tra lotti		Tra i giorni		Tra operatori		Entro la sessione/saggio		Totale		
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	
Negativo	SPCCt	144	25,7	0,00	0,0	0,30	1,1	0,00	0,0	0,70	2,8	1,40	5,5	1,60	6,3
Positività bassa per MTB, Resistenza a RIF	ICCt	144	20,0	0,00	0,0	0,20	1,1	0,00	0,0	0,40	2,0	0,90	4,6	1,00	5,1
	rpo1C	141	31,0	0,00	0,0	0,50	1,6	0,00	0,0	0,60	2,0	2,20	7,2	2,40	7,7
	rpo2C	141	29,8	0,20	0,7	0,40	1,4	0,00	0,0	0,80	2,5	2,10	7,1	2,30	7,7
	rpo3C	139	33,8	0,20	0,6	0,60	1,9	0,00	0,0	0,70	2,0	2,00	5,9	0,20	6,5
	rpo4C	141	30,4	0,80	2,5	0,50	1,7	0,00	0,0	0,80	2,5	2,50	8,4	2,80	9,2
Positività moderata per MTB, Resistenza a RIF	ICCt	144	18,4	0,30	1,4	0,00	0,0	0,10	0,5	0,10	0,3	0,70	3,7	0,80	4,1
	rpo1C	143	28,3	0,40	1,5	0,00	0,0	0,50	1,8	0,00	0,0	1,80	6,4	1,90	6,8
	rpo2C	144	27,2	0,50	1,8	0,00	0,0	0,50	1,8	0,00	0,0	1,80	6,7	1,90	7,1
	rpo3C	143	31,1	0,10	0,4	0,00	0,0	0,50	1,6	0,00	0,0	1,70	5,6	1,80	5,8
	rpo4C	144	27,2	0,80	3,1	0,00	0,0	0,70	2,4	0,00	0,0	2,20	8,0	2,40	8,9
Positività bassa per MTB, Sensibilità a RIF	ICCt	143	23,7	0,00	0,0	0,20	0,6	0,40	1,6	0,00	0,0	1,70	7,4	1,80	7,6
	rpo1C	130	30,2	0,10	0,3	0,00	0,0	0,90	3,0	0,00	0,0	2,60	8,4	2,70	9,0
	rpo2C	130	29,3	0,00	0,0	0,00	0,0	0,80	2,6	0,00	0,0	2,40	8,1	2,50	8,5
	rpo3C	130	31,5	0,00	0,0	0,00	0,0	0,80	2,6	0,20	0,7	2,30	7,4	2,50	7,8
	rpo4C	120	36,1	0,30	0,9	0,40	1,1	0,00	0,0	0,50	1,4	2,10	5,7	2,20	6,1
Positività moderata per MTB, Sensibilità a RIF	ICCt	143	21,8	0,10	0,6	0,00	0,0	0,20	1,1	0,00	0,0	1,20	5,4	1,20	5,5
	rpo1C	142	27,6	0,20	0,7	0,00	0,0	0,30	1,2	0,00	0,0	2,00	7,2	2,00	7,3
	rpo2C	141	26,7	0,00	0,0	0,40	1,4	0,00	0,0	0,10	0,2	1,60	5,9	1,60	6,1
	rpo3C	141	28,9	0,00	0,0	0,30	1,1	0,00	0,0	0,50	1,7	1,70	5,7	1,70	6,0
	rpo4C	140	33,9	0,70	2,0	0,60	1,7	0,00	0,0	0,00	0,0	2,00	5,9	2,20	6,5

16.1 Sostanze interferenti

È stato condotto uno studio in una matrice di espettorato artificiale per verificare gli effetti delle potenziali sostanze interferenti con il test Xpert MTB/RIF Ultra. È stato valutato un totale di 32 sostanze potenzialmente interferenti. Le potenziali sostanze interferenti endogene possono includere, tra l'altro, sangue, pus (globuli bianchi), cellule del tratto respiratorio, mucina, DNA umano e acido gastrico proveniente dallo stomaco. Altre sostanze potenzialmente interferenti possono includere anestetici, antibiotici, farmaci antibatterici e antitubercolotici, farmaci antivirali, broncodilatatori, broncodilatatori inalati, vaccino intranasale vivo per il virus influenzale, collutorio germicida, reagenti per l'analisi dei campioni, farmaco anti *Pneumocystis jiroveci*, farmaci omeopatici di sollievo per allergie, corticosteroidi nasali, gel nasali, spray nasali, anestetici orali, espettoranti orali, tamponi neutralizzanti e tabacco. Queste sostanze sono elencate nella Tabella 11 insieme alle concentrazioni e ai principi attivi analizzati. In questo studio sono stati inclusi campioni positivi e negativi. I campioni positivi sono stati analizzati vicino a 3 volte il limite di rilevamento analitico usando cellule BCG in replicati di 8. I campioni negativi, comprese le sostanze assenti nel ceppo MTB, sono stati analizzati per ciascuna sostanza in replicati di 8 per determinare l'effetto sulle prestazioni del controllo per il trattamento dei campioni (SPC).

Nessun effetto inibitore è stato osservato per nessuna delle 32 sostanze potenzialmente interferenti analizzate (Tabella 11).

Tabella 11. Sostanze interferenti

Sostanza	Descrizione/Principio attivo	Concentrazione analizzata
----------	------------------------------	---------------------------

Sostanza	Descrizione/Principio attivo	Concentrazione analizzata
Sangue	Sangue (umano)	5% (v/v)
Collutorio germicida	Gluconato di clorexidina (0,12%), soluzione al 20%	20% (v/v)
Reagenti per l'analisi dei campioni	Cloruro di cetilpiridinio, 1% in NaCl 2%	0,5% (v/v) in NaCl 1%
Reagenti per l'analisi dei campioni	Cloruro di cetilpiridinio, 1% in NALC 2%	0,5% (v/v) in NALC 1%
Reagenti per l'analisi dei campioni	Cloruro di cetilpiridinio, 1% in NALC 2% più 25 mM di citrato	0,5% (v/v) in NALC 1% più 12,5 mM citrato
Acido gastrico	soluzione in acqua con pH da 3 a 4, neutralizzata con bicarbonato di sodio	100% (v/v)
DNA umano/Cellule	HELA 229	10 ⁶ cellule/ml
Antimicotico; Antibiotico	Sospensione orale di nistatina, 20%	20% (v/v)
Globuli bianchi (umani)	Matrice WBC/Pus (30% di buffy-coat; 30% di plasma; 40% di PBS)	100% (v/v)
Anestetici (intubazione endotracheale)	Lidocaina HCl 4%	30% (v/v)
Soluzione nebulizzante	NaCl 5% (p/v)	5% (p/v)
Mucina	Mucina 5% (p/v)	5% (p/v)
Antibatterico sistemico	Levofloxacina 25 mg/ml	5 mg/ml (p/v)
Corticosteroidi nasali	Fluticasone 500 mcg/spruzzo	5 µg/ml (p/v)
Broncodilatatori inalati	Solfato di albuterolo 2,5 mg/3 ml	75 µg/ml (p/v)
Anestetici orali	Orajel (20% benzocaina)	5% (p/v)
Farmaci antivirali	Aciclovir, IV 50 mg/ml	50 µg/ml (p/v)
Unguento nasale antibiotico	Neosporina (Bacitracina 400U, Neomicina 3,5 mg, Polimixina B 5000U)	5% (p/v)
Tabacco	Nicogel (40% estratto di tabacco)	0,5% (p/v)
Farmaci antitubercolari	Streptomina 1 mg/ml	25 µg/ml (p/v)
Farmaci antitubercolari	Etambutolo 1 mg/ml	50 µg/ml (p/v)
Farmaci antitubercolari	Isoniazide 1 mg/ml	50 µg/ml (p/v)
Espettoranti orali	Guaifenesina (400 mg/ compressa)	5 mg/ml (p/v)
Farmaci antitubercolari	Pirazinamide 10 mg/ml	10 µg/ml (p/v)
Gel nasale (omeopatico)	Zicam gel	50% (p/v)
Spray nasale	Fenilefrina 0,5%	1% (p/v)
Farmaci antitubercolari	Rifampicina 1 mg/ml	25 µg/ml (p/v)
Farmaco per il sollievo dalle allergie (omeopatico)	Olio dell'albero del tè (<5% Cineole, >35% terpinen-4-olo)	0,5% (p/v)

Sostanza	Descrizione/Principio attivo	Concentrazione analizzata
Vaccino intranasale vivo contro il virus influenzale	Vaccino vivo contro il virus influenzale FluMist	5% (p/v)
Farmaco per <i>Pneumocystis jiroveci</i>	Pentamidina	300 ng/ml (p/v)
Broncodilatatore	Epinefrina (formula iniettabile)	1 mg/ml (p/v)
Farmaci antitubercolari	Amoxicillina	25 µg/ml (p/v)

16.2 Sensibilità analitica (limite di rilevamento)

Sono stati effettuati studi per determinare la sensibilità analitica o limite di rilevamento (LoD) del test Xpert MTB/RIF Ultra utilizzando il ceppo *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e *Mycobacterium bovis* BCG (bacillo di Calmette-Guérin) diluiti in espettorato umano e sedimento di espettorato umano. Un risultato positivo per MTB si basa sul rilevamento dei bersagli IS1081/IS6110.

Sono stati effettuati studi anche per determinare la sensibilità analitica o limite di rilevamento del test Xpert MTB/RIF Ultra per il rilevamento della resistenza a RIF utilizzando un ceppo clinico ben caratterizzato di *Mycobacterium tuberculosis* con resistenza alla rifampicina (TDR125) che presenta una mutazione D516V nella regione “core” di 81 coppie di basi del gene *rpoB*, diluito in espettorato umano e sedimento di espettorato umano.

Il LoD è la concentrazione più bassa espressa in UFC/ml che può essere differenziata in modo riproducibile dai campioni negativi con confidenza del 95%. Sono stati valutati almeno 20 replicati per due ceppi a 5-8 concentrazioni nel corso di 3 giorni e il LoD è stato determinato utilizzando l’analisi probit. I valori LoD dichiarati sono riassunti nella tabella sottostante.

Tabella 12. Dati dell’analisi probit e LoD dichiarato espresso in UFC/ml

Specie di micobatteri	Tipo di campione di analisi	LoD dichiarato
<i>M. bovis</i> (BCG)	Espettorato	30
	Espettorato sedimentato	21
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	Espettorato	12
	Espettorato sedimentato	25

Tabella 13. Dati dell’analisi probit e LoD dichiarato della resistenza a RIF espresso in UFC/ml

Specie di micobatteri	Tipo di campione di analisi	LoD dichiarato
<i>M. tuberculosis</i> (TDR125)	Espettorato	1093
	Espettorato sedimentato	4000

16.3 Specificità analitica (esclusività)

Le colture di 30 ceppi di micobatteri non tubercolotici (NTM) sono state analizzate con il test Xpert MTB/RIF Ultra. Tre replicati di ciascun isolato sono stati inoculati in un tampone e analizzati a una concentrazione di $\geq 10^7$ CFU/ml. Vedere la Tabella 14.

Tabella 14. Ceppi NTM analizzati per la specificità

<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>Mycobacterium celatum</i>	<i>Mycobacterium simiae</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium szulgai</i>
<i>Mycobacterium goodii</i>	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>

<i>Mycobacterium haemophilum</i>	<i>Mycobacterium triviale</i>
<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium vaccae</i>
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	<i>Mycobacterium xenopi</i>
<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	<i>Mycobacterium interjectum</i>
<i>Mycobacterium gastri</i>	<i>Mycobacterium peregrinum</i>
<i>Mycobacterium genavense</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Mycobacterium goodii</i>
<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Mycobacterium shimoidei</i>
<i>Mycobacterium malmoense</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>
<i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Mycobacterium terrae</i>

Alle condizioni di questo studio, tutti gli isolati NTM sono stati segnalati come **MTB NON RILEVATO (MTB NOT DETECTED)**. Nello studio sono stati inclusi controlli positivi e negativi. La specificità è stata del 100%.

Inoltre, allo scopo di determinare se alte concentrazioni di NTM interferirebbero con il rilevamento di bassi livelli (3X LoD) di TB, sei ceppi rappresentativi di quelli elencati nella Tabella 14 sono stati miscelati con il ceppo di TB H37Rv e con *M. bovis* in espettorato per ottenere una concentrazione finale di rispettivamente 10⁶ CFU/ml di NTM, 36 CFU/ml di *M. tuberculosis* H37Rv e 90 CFU/ml di *M. bovis*.

I ceppi NTM analizzati per la capacità di interferire con TB (H37Rv) rilevata includevano:

- *M. abscessus*, ATCC 19977
- *M. avium*, isolati clinici del National Jewish Hospital
- *M. celatum*, isolati clinici del National Jewish Hospital
- *M. kansasii*, ATCC 12478
- *M. goodii*, ATCC 14470
- *M. intracellulare*, isolati clinici del National Jewish Hospital

I ceppi NTM analizzati non interferivano con il rilevamento di 36 CFU/ml di *M. tuberculosis* (H37Rv) o di 90 CFU/ml di *M. bovis*, pertanto i segnali erano gli stessi di quelli per il ceppo H37Rv analizzato da solo.

16.4 Specie/ceppi analizzati per la specificità

I seguenti microorganismi, compresi batteri Gram-negativi e Gram-positivi, organismi fungini, virus e lieviti, sono stati analizzati per determinare la falsa positività nel test Xpert MTB/RIF Ultra. I replicati di ciascun isolato sono stati inoculati nel tampone e analizzati a una concentrazione di $\geq 10^7$ UFC/ml (ceppi batterici e fungini) o $\geq 10^6$ copie/ml (DNA genomico per batteri e funghi) e $\geq 10^5$ TCID₅₀/ml (ceppi virali).

Tabella 15. Specie e ceppi

<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Virus respiratorio sinciziale tipo B</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Rhinovirus</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Chlamydomyxa pneumoniae</i>	<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Virus parainfluenzale tipo 1</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Coronavirus</i>	<i>Virus parainfluenzale tipo 2</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Virus parainfluenzale tipo 3</i>	<i>Streptococcus mutans</i>

<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Virus respiratorio sinciziale tipo A</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Metapneumovirus umano (hMPV) 16 tipo A1</i>		

In base alle condizioni dello studio, tutti i microrganismi analizzati sono stati segnalati come **MTB NON RILEVATO (MTB NOT DETECTED)**. Nello studio sono stati inclusi controlli positivi e negativi. La specificità è stata del 100%.

16.5 Inclusività analitica

37 ceppi del complesso MTB costituiti da 16 ceppi sensibili alla rifampicina con una regione core *rpoB* wild-type e 21 ceppi resistenti alla rifampicina sono stati analizzati utilizzando il test Xpert MTB/RIF Ultra. I campioni di DNA provenienti da un totale di 37 ceppi di MTB sono stati analizzati sul GeneXpert usando un protocollo Xpert MTB/RIF Ultra modificato per l'analisi del DNA. I componenti della reazione finale e le condizioni del ciclo di PCR erano invariati rispetto al protocollo progettato per l'analisi di campioni dei pazienti. Dodici dei ceppi provenivano dalla raccolta OMS/TDR e 6 dalla raccolta di laboratorio presso Rutgers University. Collettivamente, questi ceppi rappresentavano isolati provenienti da 8 Paesi e contenevano 21 isolati resistenti a RIF composti da mutazioni singole, doppie e una tripla della regione core del gene *rpoB*. I campioni sono stati analizzati aggiungendo 100 µl del campione di DNA alla camera lisato della cartuccia. Le reazioni negative utilizzavano tampone come campione. Il saggio ha identificato correttamente tutti i 16 ceppi wild-type e identificato correttamente la resistenza alla rifampicina in 18 dei 21 ceppi resistenti alla rifampicina con mutazioni nella regione core del gene *rpoB*. Per 3 ceppi mutanti sono stati ottenuti risultati incerti della resistenza alla rifampicina. *M. caprae* e *M. pinnipedii* non sono stati valutati nell'ambito di questo studio.

16.6 Inattivazione analitica di micobatteri in campioni di espettorato

La capacità di disinfezione del reagente per il campione Xpert MTB/RIF Ultra è stata determinata utilizzando un metodo standardizzato quantitativo di coltura tubercolicida.¹² 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 del 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.

17 Riferimenti bibliografici

1. WHO report 2018. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf?ua=1>.
2. WHO Global TB Report 2019. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf>.
3. Anti-tuberculosis resistance in the world: fourth global report. WHO/HTM/TB/2008.394.
4. Morris SL, Bai GH, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M, Rouse D. Molecular mechanisms of multidrug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1995. 171:954-60.
5. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. 1998. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives, *Emerging Infectious Diseases*, Vol.4 No.2, <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol4no2/rattan.htm>.
6. Francis J. Curry National Tuberculosis Center and California Department of Public Health, 2008: Drug-Resistant Tuberculosis, A Survival Guide for Clinicians, Second Edition.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 1993. Richmond JY and McKinney RW (eds). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (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 Hazardous Substances (26 marzo 2012) (29 C.F.R., parte 1910, sottoparte Z).

11. Kent PT, Kubica GP. 1985. *Public Health Mycobacteriology—A Guide for Level III Laboratory*, Centers of Disease Control, Atlanta, Pubblicazione n. PB 86-216546.
12. 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.

18 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

19 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

20 Tabella dei simboli

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



21 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.