

GenoType MTBDR*plus*

VER 2.0

Instruções de Uso

IFU-304A-06

CE

IVD

apenas para uso em diagnóstico in vitro

GenoType MTBDRplus VER 2.0

Teste de Genética Molecular para a Identificação do Complexo *M. tuberculosis* e da sua Resistência à Rifampicina e Isoniazida a partir de Amostras Clínicas e de Amostras Cultivadas

Por favor leia as instruções completamente e cuidadosamente antes de usar o kit. Siga estritamente os procedimentos estabelecidos para obter resultados de teste correctos.

Uso Pretendido

O teste **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 é um teste in vitro qualitativo para a identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à rifampicina (RMP) e/ou isoniazida (INH) a partir de espécimes pulmonares clínicos com microscopia positiva ou negativa e amostras cultivadas. As espécies seguintes são incluídas na tuberculose (TB) – causando o complexo *M. tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii*, e *M. pinnipedii*. A identificação da resistência à rifampicina é facultada pela detecção das mutações mais significativas associadas ao gene *rpoB* (que codifica a subunidade β da ARN polimerase). Para a detecção da resistência à isoniazida é examinado o gene *katG* (que codifica a catalase peroxidase), e a região promotora do gene *inhA* (que codifica o NADH-enoil-ACP-redutase).

O teste é indicado como um apoio no diagnóstico com aplicação em laboratórios médicos.

Sumário e Explicação

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa bacteriana passada através de gotículas infectadas. Em 2013, estimou-se a existência de 9 milhões de incidentes provocados por TB a nível global, e 1,5 milhões de mortes ocorridas [1]. Tratamento de TB requer uma terapia durante vários meses. O aparecimento e propagação da tuberculose multiresistente (MDR-TB) é o maior problema médico e público que ameaça saúde global. A MDR-TB está definida como a TB que é pelo menos resistente à RMP e INH, as duas drogas de primeira-linha anti-TB [2] mais importantes. A MDR-TB é um desafio para o controlo da TB devido ao seu diagnóstico complexo e obstáculos no tratamento. Estimou-se, em 2013, a existência de 480.000 casos de MDR-TB a nível mundial existiram 11 milhões de casos de TB [1].

Enquanto que o MDR-TB não é confirmado o uso de inadequado e conseqüentemente ineficaz de antibióticos podem conduzir a um alastramento da bactéria resistente e à amplificação da sua resistência. Deste modo, um diagnóstico rápido e a identificação da MDR-TB são um pré-requisito para um tratamento apropriado.

Princípios do Procedimento

O teste **GenoType MTBDRplus** é baseado na tecnologia **DNA•STRIP**. O procedimento completo é dividido em três passos: (i) extracção do ADN a partir de amostras clínicas (pulmonares, descontaminadas) ou material cultivado (meio sólido/líquido)– os reagentes necessários não são fornecidos, (ii) uma amplificação multiplex com primers biotinilados, e (iii) uma hibridização reversa.

Todos os reagentes necessários para amplificação, tal como polimerase e primers estão incluídos nas Misturas de Amplificação A e B (AM-A e AM-B) que foram optimizadas para este teste. As tiras de membrana são recobertas com sondas específicas complementares aos ácidos nucleicos amplificados. Após a desnaturação química, os amplicons de cadeia única ligam-se às sondas (hibridização). A ligação altamente específica de cadeias complementares de ADN é assegurada por condições estritas que são o resultado da combinação da composição do tampão e uma certa temperatura. Assim as sondas distinguem com segurança várias variações da sequência nas regiões de gene examinado. A streptavidina conjugada com a fosfatase alcalina, liga-se à biotina dos amplicons por via da streptavidina. Finalmente, a fosfatase alcalina transforma o substrato adicionado num corante que se torna visível nas tiras de membrana como um precipitado colorido. Um modelo assegura uma interpretação fácil e rápida do padrão de bandas obtido.

Armazenamento e Descarte dos Componentes do Kit

1/2 Componente 1 de 2 do kit

2/2 Componente 2 de 2 do kit

Armazene todos os Componentes 1 do kit a 2-8°C. Armazene todos os Componentes 2 do kit a -20°C, e mantenha-os isolados de ADN contaminante. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos do AM-A e AM-B; quando processar apenas um pequeno número de amostras por corrida, alíquote a AM-A e AM-B. Não use os reagentes para além do seu prazo de validade. Descarte os reagentes não usados e resíduos de acordo com os regulamentos federais, estaduais e locais.

Precauções para Manusear os Componentes do Kit

Observe todos os regulamentos ambientais e de segurança federais, estaduais e locais. Use sempre luvas e roupa protectora apropriada.

Ao manusear os reagentes do kit, devem ser aplicadas as seguintes medidas especiais de segurança:

O Tampão de Hibridização (**HYB**) e o Substrato Concentrado (**SUB-C**) não são classificados como perigosos, devido a seus ingredientes, no entanto, as advertências de perigo EUH210 são aplicáveis: Ficha de segurança fornecida a pedido.



Solução de Desnaturação (**DEN**) contém <2% de hidróxido de sódio.

Atenção!

H315: Provoca irritação cutânea. H319: Provoca irritação ocular grave.

P280: Usar luvas de protecção/roupa de protecção/protecção ocular. P305+351+338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P313: Consulte um médico.

Para informação adicional, por favor consulte a ficha de dados de segurança podendo também obter-se por download a partir da morada: www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Controlo da Qualidade

Por forma a validar o desempenho correcto do teste e o funcionamento apropriado dos componentes do kit, cada tira inclui 5 zonas de controlo:

- uma zona de Controlo do Conjugado (CC), conferindo a ligação do conjugado na tira e uma reacção cromogénica correcta
- uma zona de Controlo de Amplificação (AC) para verificar a reacção de amplificação
- três zonas de Controlo de Loci (*rpoB*, *katG* e *inhA*) para verificar a sensibilidade óptima da reacção para cada um dos Loci dos genes testados

Observe as precauções habituais para preparar a amplificação. É essencial que todos os materiais (tal como pipetas) que entrem em contacto com os reagentes estejam livres de DNases.

Não troque ou junte Misturas de Amplificação ou tiras de membrana de kits diferentes a menos que os lotes sejam idênticos.

Uma amostra de controlo negativo para a detecção de possíveis contaminações contendo água (para uso em biologia molecular) em vez de ADN deve ser testada em cada corrida de teste; a tira de teste respectiva deveria mostrar unicamente as bandas CC e AC.

Requisitos dos Espécimes

Como material inicial para a extracção de ADN podem ser usadas amostras clínicas pulmonares descontaminadas com microscopia positiva ou negativa como expectoração (indução ou expectoração), material bronquial (i.e. lavagens broncoalveolares) ou aspirados (i.e. aspirado pleural) assim como amostras cultivadas (meio sólido/líquido). Até à presente edição das instruções em seu poder, o desempenho do teste não foi validado com outros materiais de amostra para além dos mencionados anteriormente.

Precauções para o manuseio de espécimes.

Os espécimes de pacientes e as culturas feitas a partir de espécimes de pacientes devem ser sempre considerados como potencialmente infecciosos e manuseados de acordo (i.e. ver [3] ou [4]). Use sempre luvas e roupa protectora apropriada. As amostras de pacientes de risco (infectados por microrganismos patogénicos incluindo a Hepatite B e o Vírus de imunodeficiência Humana (HIV)) e as culturas feitas a partir dessas amostras devem ser sempre rotuladas e manuseadas sob condições adequadas de segurança de acordo com as directrizes institucionais.

O manuseamento de espécimes potencialmente infecciosos deve ser realizado numa câmara de segurança classe II. Amostras potencialmente infecciosas devem ser centrifugadas numa câmara de segurança classe II ou num rotor estanque a aerossóis. Este rotor só deve ser aberto na câmara de segurança. Amostras inactivadas podem ser centrifugadas, fora da câmara de segurança, num rotor standard.

Descarte as pontas de pipeta usadas imediatamente após o uso para um contentor de resíduos biológicos perigosos. Após o fim do ensaio, descarte todos os consumíveis descartáveis usados para contentor de resíduos biológicos perigosos.

Armazenamento e transporte

Todos os espécimes devem ser colhidos e transportados como recomendado na publicação CDC "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [5], "Clinical Microbiology Procedures Handbook" [6], ou o manual de procedimentos do laboratório.

Deve-se assegurar que até a descontaminação se realizar, os espécimes são mantidos em contentores esterilizados de plástico a uma temperatura de 2-8°C. O transporte de espécimes a temperatura ambiente deve ser realizado o mais depressa possível e deve ser realizado em 1-2 dias [7,8]. Os espécimes usados para a descontaminação não devem ter mais que 4 dias.

Após a descontaminação e subsequente ressuspensão do pellet bacteriano no tampão fosfato, as amostras podem ser armazenadas a -20 ou -80°C por um período máximo de 5 dias até ser realizada a extracção de ADN.

Preparação

As amostras clínicas devem ser processadas usando o método NALC/NaOH de acordo com a publicação CDC "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [5]. Após a descontaminação o pellet celular deve ser ressuspensionado, no máximo em 1 a 1,5 ml de tampão fosfato. Quando analisa amostras de pacientes, volumes mais elevados podem pôr em causa a sensibilidade do teste. Devido à potencial falta de homogeneidade do espécime, a amostra descontaminada deve-se misturar antes de se remover a alíquota a ser analisada, de outro modo, a sensibilidade do teste pode ser influenciada.

Quando a amostra é para ser cultivada, a cultura pode ser realizada ou em meio sólido (ex. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) ou em meio líquido (ex. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)).

O manuseamento de espécimes potencialmente infecciosos deve ser realizado numa câmara de segurança classe II.

Extracção de ADN

Como material inicial para a extracção de ADN podem ser usadas amostras descontaminadas de pacientes, assim como, bactérias cultivadas em meio sólido (i.e. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) ou em meio líquido (i.e. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). A área de trabalho tem que estar livre de ADN contaminante.

Para a extracção de ADN de espécimes clínicos descontaminados ou material cultivado é usado o kit **GenoLyse**[®] de acordo com o protocolo A (veja capítulo Informações para Encomenda). Alternativamente, o equipamento **GenoXtract**[®] em combinação com o **GXT DNA/RNA Extraction Kit** (veja capítulo Informações para Encomenda) pode ser usado para extracção automática de ADN a partir de espécimes de pacientes. Para instruções de utilização, por favor recorra às respectivas instruções de uso.

Os métodos descritos acima foram usados para avaliar o desempenho do teste **GenoType MTBDRplus**. Até à presente edição das instruções em seu poder, o desempenho do teste não foi validado com outros métodos de extracção de ADN ou material de amostra.

Amplificação

Todos os reagentes necessários para amplificação, tal como polimerase e primers estão incluídos nas Misturas de Amplificação A e B (AM-A e AM-B) que foram optimizadas para este teste. Após a descongelação, centrifugue brevemente AM-A e AM-B a mistura cuidadosamente pipetado para cima e para baixo. Pipete AM-A e AM-B numa sala livre de ADN contaminante. A solução de ADN deve ser adicionada numa área separada.

Prepare para cada amostra:

Após a extracção de ADN com o **GenoLyse**[®]

- 10 µl AM-A (ver Componente 2 do kit)
 - 35 µl AM-B (ver Componente 2 do kit)
 - 5 µl de solução de ADN
- Volume final: 50 µl

Após a extracção de ADN com o **GXT DNA/RNA Extraction Kit**

- 10 µl AM-A (ver Componente 2 do kit)
 - 35 µl AM-B (ver Componente 2 do kit)
 - 10 µl de solução de ADN
- Volume final: 55 µl

Determine o número de amostras (número de amostras a ser analisadas mais as amostras controle). Prepare o número de tubos necessários. Prepare uma "master mix" contendo AM-A e AM-B e misture com cuidado mas completamente (não use o vortex). Alternativamente, o conteúdo de um tubo de reação AM-A pode ser completamente transferido para o tubo de reação AM-B. Vamos obter 0,68 ml de "master mix" para 12 reações de amplificação (kit de 12 testes) ou 4x 1,35 ml para 4x 24 reações de amplificação (kit de 96 testes), respectivamente. Por favor note que a "master mix" necessita de ser preparada de novo a cada utilização. Faça alíquotas de 45 µl para tubos de PCR e adicione 5 ou 10 µl de água (ver acima) a uma das alíquotas (controle negativo). Adicione, numa área separada 5 ou 10 µl de solução de ADN a cada alíquota (excepto para o controle negativo).

Programa de amplificação:

Quando usar um termociclador da Hain Lifescience com a respectiva pré-instalação, seleccione o protocolo "MDR DIR" para amostras clínicas ou o protocolo "MDR CUL" para amostras cultivadas.

		Amostras clínicas	Amostras cultivadas
15 min	95°C	1 ciclo	1 ciclo
30 sec	95°C	20 ciclos	10 ciclos
2 min	65°C		
25 sec	95°C	30 ciclos	20 ciclos
40 sec	50°C		
40 sec	70°C		
8 min	70°C	1 ciclo	1 ciclo
Taxa de aquecimento		≤2,2°C/sec	≤2,2°C/sec

Os produtos de amplificação poderão ser armazenados de +8 a -20°C.

Hibridização

Quando usa um equipamento de hibridização da Hain Lifescience, por favor veja o documento "Overview equipment programs" disponível em www.hain-lifescience.com para o nome do protocolo de hibridização a ser usado.

O protocolo seguinte descreve a hibridização manual usando um banho de água ou um **TwinCubator**.

Preparação

Pré-aqueça o banho de água com agitação a **45°C** (o desvio máximo tolerado em relação à temperatura alvo é de +/-1°C) ou ligue o **TwinCubator**. Pré-aqueça as soluções HYB e STR a 37-45°C antes de as usar. Os reagentes têm que estar livres de precipitados (note, no entanto, que a solução CON-D é opaca). Misture se necessário. Aqueça os restantes reagentes, com excepção do CON-C e do SUB-C, à temperatura ambiente. Usando um tubo adequado, dilua 1:100 o Conjugado Concentrado (CON-C, laranja) e o Substrato Concentrado (SUB-C, amarelo) com as quantidades necessárias dos respectivos tampões (**CON-C com CON-D, SUB-C com SUB-D**). Agite bem e deixe estabilizar à temperatura ambiente. Para cada tira, adicione 10 µl de concentrado a 1 ml do tampão respectivo. Dilua o CON-C antes de cada utilização. O SUB-C diluído é estável durante 4 semanas se armazenado à temperatura ambiente e protegido da luz.

- Dispense 20 µl da Solução de Desnaturação (DEN, azul) num canto de cada um dos poços usados.**
- Adicione à solução 20 µl da amostra amplificada, com a pipeta aspire e dispense para misturar bem e incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.**
Entretanto, retire as tiras do tubo, usando uma pinça, e marque-as com um lápis abaixo do marcador colorido. Use sempre luvas quando está a manusear as tiras.
- Cuidadosamente, adicione a cada poço 1 ml de Tampão de Hibridização (HYB, verde) pré aquecido. Agite suavemente a tina até que a solução adquira uma cor homogénea.**
Tenha cuidado para não salpicar solução para os poços vizinhos.
- Coloque uma tira em cada poço.**
As tiras têm que ficar completamente imersas na solução e com o lado revestido pelas sondas (identificável pela marcador colorido perto da extremidade inferior) virado para cima. Usando pinças, volte as tiras que poderão ter ficado com a face referida voltada para baixo aquando da imersão na solução. Limpe cuidadosamente as pinças depois de cada utilização para evitar contaminação. O mesmo se aplica aos passos seguintes.
- Coloque a tina num banho de água com agitação/TwinCubator e incube durante 30 minutos a 45°C.**
Ajuste a frequência da agitação de maneira a obter uma mistura constante e completa da solução. Para permitir uma transferência de calor adequada, a tina tem que ser imersa na água até, pelo menos, 1/3 da sua altura.
- Aspire completamente o Tampão de Hibridização.**
Use, por exemplo, uma pipeta Pasteur ligada a uma bomba de vácuo.
- Adicione 1 ml de Solução de Lavagem Adstringente (STR, vermelho) a cada tira e incube durante 15 minutos a 45°C num banho de água com agitação/TwinCubator.**
- A partir deste passo, trabalhe à temperatura ambiente.**
Remova completamente a Solução de Lavagem Adstringente.
Rejeite a Solução de Lavagem para um contentor e remova todos os fluidos remanescentes, voltando ao contrário a tina e colocando-a sobre papel absorvente. Este procedimento também se aplica a todos os outros passos de lavagem.
- Lave cada tira uma vez com 1 ml de Solução Rinse (RIN) durante 1 minuto numa plataforma de agitação/TwinCubator (rejeite o RIN depois da incubação).**
- Adicione 1 ml do conjugado diluído (ver acima) a cada tira e incube durante 30 minutos numa plataforma de agitação/TwinCubator.**
- Remova a solução e lave cada tira duas vezes, durante 1 minuto, com 1 ml de Solução Rinse (RIN) e uma vez, durante 1 minuto, com aproximadamente 1 ml de água destilada (ex., use uma garrafa de lavagem) numa plataforma de agitação/TwinCubator (rejeite a solução em cada lavagem).**
Assegure-se que remove quaisquer vestígios de água depois da última lavagem.
- Adicione 1 ml de substrato diluído (ver acima) a cada tira e incube no escuro sem agitação.**
Dependendo das condições do teste (por ex., temperatura ambiente), o tempo de incubação do substrato, i.e. o tempo até as bandas estarem claramente visíveis, pode variar entre 3 e 20 minutos. Um alongamento dos tempos de incubação do substrato pode levar a um aumento do ruído da coloração de fundo, o que pode impossibilitar a interpretação dos resultados.
- Pare a reacção assim que as bandas estiverem claramente visíveis enxaguando brevemente por duas vezes com água destilada.**
- Usando pinças, remova as tiras da tina e seque-as entre duas camadas de papel absorvente.**

Avaliação e Interpretação dos Resultados

Cole as tiras a armazenem-as protegidas da luz. Uma ficha de avaliação é fornecida com o kit. Ao usar esta ficha de avaliação, cole as tiras desenvolvidas nos campos designados alinhando as bandas CC e AC com as linhas respectivas na ficha. Por razões técnicas as distâncias nas tiras entre sondas únicas podem variar ligeiramente. **Para uma avaliação precisa por favor use o modelo fornecido e alinhe – o separadamente para cada um dos locis – com a Zona de Controlo do Locus respectivo.** Determinar o status de resistência e anotar na respectiva coluna. No capítulo subsequente são dados exemplos de avaliação que podem servir como ajuda à interpretação. Cada tira possui um total de 27 zonas de reacção (ver a figura).

.....	Controlo do Conjugado (CC)
.....	Controlo de Amplificação (AC)
.....	<i>M. tuberculosis</i> complex (TUB)
.....	<i>rpoB</i> Controlo do Locus (<i>rpoB</i>)
.....	<i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 1 (<i>rpoB</i> WT1)
.....	<i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 2 (<i>rpoB</i> WT2)
.....	<i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 3 (<i>rpoB</i> WT3)
.....	<i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 4 (<i>rpoB</i> WT4)
.....	<i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 5 (<i>rpoB</i> WT5)
.....	<i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 6 (<i>rpoB</i> WT6)
.....	<i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 7 (<i>rpoB</i> WT7)
.....	<i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 8 (<i>rpoB</i> WT8)
.....	<i>rpoB</i> sonda de mutação 1 (<i>rpoB</i> MUT1)
.....	<i>rpoB</i> sonda de mutação 2A (<i>rpoB</i> MUT2A)
.....	<i>rpoB</i> sonda de mutação 2B (<i>rpoB</i> MUT2B)
.....	<i>rpoB</i> sonda de mutação 3 (<i>rpoB</i> MUT3)
.....	<i>katG</i> Controlo do Locus (<i>katG</i>)
.....	<i>katG</i> sonda tipo selvagem (<i>katG</i> WT)
.....	<i>katG</i> sonda de mutação 1 (<i>katG</i> MUT1)
.....	<i>katG</i> sonda de mutação 2 (<i>katG</i> MUT2)
.....	<i>inhA</i> Controlo do Locus (<i>inhA</i>)
.....	<i>inhA</i> sonda tipo selvagem 1 (<i>inhA</i> WT1)
.....	<i>inhA</i> sonda tipo selvagem 2 (<i>inhA</i> WT2)
.....	<i>inhA</i> sonda de mutação 1 (<i>inhA</i> MUT1)
.....	<i>inhA</i> sonda de mutação 2 (<i>inhA</i> MUT2)
.....	<i>inhA</i> sonda de mutação 3A (<i>inhA</i> MUT3A)
.....	<i>inhA</i> sonda de mutação 3B (<i>inhA</i> MUT3B)
.....	marcador colorido

Nota: A tira não é exibida no tamanho original.

Controlo do Conjugado (CC)

Tem que haver desenvolvimento de uma linha nesta zona, documentando a eficiência da ligação do conjugado e da reacção do substrato.

Controlo de Amplificação (AC)

Quando o teste é realizado correctamente o amplicon de controlo vai-se ligar à zona de Controlo de Amplificação.

No caso de um resultado positivo, o sinal da zona de Controlo de Amplificação pode ser fraco ou mesmo desaparecer. Isto pode-se dever a reacções de competição durante a amplificação. Neste caso o teste foi realizado correctamente e o teste não precisa de ser repetido.

Quando só se desenvolvem as bandas CC e AC, estamos perante um resultado negativo válido. Uma banda AC ausente, no caso, de um resultado de teste negativo indica erros durante a preparação e/ou desempenho da reacção de amplificação ou a presença de inibidores de amplificação. Neste caso, o teste não é válido e o teste tem de ser repetido com a amostra respectiva.

Complexo *M. tuberculosis* (TUB)

Esta zona hibridiza, tanto como se conhece, com amplicons gerados a partir de todos os membros conhecidos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Se a zona TUB é negativa e ao mesmo tempo não existe um padrão de resistência avaliável, a amostra testada não contém bactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e não pode ser avaliada por este sistema de teste.

Em casos raros, a zona TUB pode ser negativa e desenvolver-se um padrão de resistência avaliável. Se acontecer deve-se suspeitar da presença de uma estirpe pertencente ao complexo *M. tuberculosis* e o teste deve ser repetido (veja abaixo "casos especiais" nº 3).

Controlo de Loci (*rpoB*, *katG* e *inhA*)

As zonas de Controlo de Loci detecta a região do gene específica para o respectivo loci. No caso de um resultado positivo (padrão de bandas tipo selvagem e de mutação avaliáveis), o sinal da zona de Controlo de Loci pode ser fraco.

Sondas tipo selvagem

As sondas tipo selvagem incluem as áreas de resistência mais importantes dos genes respectivos (ver figura 1, assim como as tabelas 1, 2 e 3). Quando todas as sondas tipo selvagem de um gene apresentam um sinal positivo, não existe mutação detectável dentro das regiões examinadas. Isto indica que a estirpe testada é sensível ao antibiótico respectivo. No caso de uma mutação, o respectivo amplicon não se pode ligar à sonda tipo selvagem correspondente. A ausência de sinal para, pelo menos, uma das sondas tipo selvagem indica resistência da estirpe testada ao antibiótico.

Cada padrão que se desvie do padrão tipo selvagem indica resistência da estirpe testada. O padrão de bandas obtido com as sondas *rpoB* permite tirar conclusões acerca da resistência à rifampicina da estirpe testada, o padrão de bandas obtido com as sondas *katG* e as sondas *inhA* permite tirar conclusões acerca do nível de resistência à isoniazida da estirpe testada.

Sondas de mutação

As sondas de mutação detectam algumas das mutações mais comuns que medeiam a resistência (ver tabela 1, 2 e 3). Comparada com as outras sondas, os sinais positivos da sonda de mutação *rpoB* MUT2A e MUT2B podem apresentar um sinal mais fraco.

Em casos raros, quando a banda *rpoB* MUT3 é positiva, pode ser detectada uma coloração fraca na banda *rpoB* WT8 que deve ser considerada negativa.

Cada padrão que se desvie do padrão tipo selvagem indica resistência da estirpe testada. O padrão de bandas obtido com as sondas *rpoB* permite tirar conclusões acerca da resistência à rifampicina da estirpe testada e o padrão de bandas *katG* e *inhA* acerca da resistência à isoniazida.

Por favor note:

Somente as bandas com uma intensidade igual ou superior à intensidade da zona de Controlo de Amplificação devem ser consideradas.

As bandas de uma tira não têm que mostrar todas a mesma intensidade de sinal.

Notar os seguintes casos especiais:

1. Existe a possibilidade dos espécimes testados conterem uma estirpe heteroresistente. No caso de heteroresistencia, pode ser detectada, na amostra respectiva, uma sequência de mutação e de tipo selvagem; deste modo, uma das sondas de mutação assim como a sonda tipo selvagem correspondente pode aparecer positiva na respectiva tira. Se a resistência respectiva se torna fenotipicamente evidente depende da razão de sequências mutadas e não mutadas no estudo.
2. Existe a possibilidade dos espécimes testados conterem mais do que uma estirpe do complexo *M. tuberculosis* (devido à mistura de culturas ou contaminação). Se, pelo menos, uma destas estirpes possuir uma mutação, uma das sondas de mutação assim como a sonda tipo selvagem

correspondente pode aparecer positiva. Se a resistência respectiva se torna fenotipicamente evidente depende da razão de estirpes resistentes e sensíveis no estudo.

- Existe a possibilidade que devido a uma infecção mista a amostra testada possua uma estirpe do complexo *M. tuberculosis* e um *Mycobacterium* não tuberculoso. Em casos raros, a banda TUB pode estar ausente devido à competição na reacção de amplificação única durante o PCR. No entanto, quando se desenvolve um padrão de resistência avaliável, deve-se suspeitar da presença de uma estirpe pertencente ao complexo *M. tuberculosis* e o teste deve ser repetido.
 - Em casos raros, todas as bandas de um locus de gene (incluindo a banda de Controlo de Locus) pode desaparecer completamente da tira de teste. Se este resultado é gerado a partir de uma amostra clínica, as causas possíveis, mas não limitadas a, podem ser, concentração de ADN na amostra inferior ao limite de detecção ou a presença de substâncias interferentes na amostra. Este padrão de bandas não pode ser avaliado e o teste tem de ser repetido.
- Se uma amostra de cultura gerar um resultado com a ausência completa do locus *katG*, podemos concluir que existe uma resistência ao INH da estirpe testada.

Regiões de resistência e mutações comuns que medeiam a resistência



Figura 1: Região de resistência à rifampicina do gene *rpoB*

rpoB WT1-8: sondas *rpoB* tipo selvagem; *rpoB* MUT1-3: sondas de mutação *rpoB*. Os números especificam as posições dos aminoácidos (codões) para todas as mutações listadas na tabela. Os codões para os quais as sondas foram desenhadas estão sublinhados.

Tabela 1: Mutações no gene *rpoB* e as bandas correspondentes tipo selvagem e de mutação [9]

Ausência da banda tipo selvagem	Codão analisado	Desenvolvimento da banda de mutação	Mutação
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		E510H L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

* Estas mutações raras foram apenas detectadas teoricamente (in silico).

Tabela 2: Mutações no gene *katG* e as bandas correspondentes tipo selvagem e de mutação

Ausência da banda tipo selvagem	Codão analisado	Desenvolvimento da banda de mutação	Mutação
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

Tabela 3: Mutações na região promotora *inhA* e as bandas correspondentes tipo selvagem e de mutação

Ausência da banda tipo selvagem	Posição do ácido nucleico analisado	Desenvolvimento da banda de mutação	Mutação
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1 <i>inhA</i> MUT2	C-15T A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A <i>inhA</i> MUT3B	T-8C T-8A

Exemplos de Avaliação

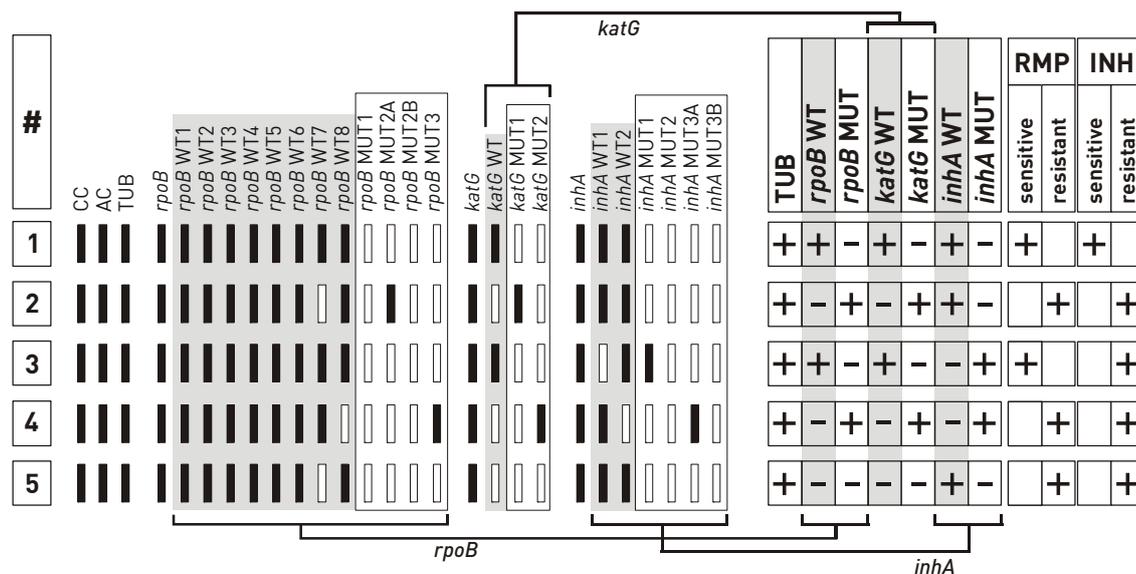


Figura 2: Exemplos de padrões de bandas e da sua avaliação relativamente à resistência à rifampicina e/ou isoniazida

Se todas as sondas tipo selvagem apresentarem um sinal, classificar como positivo e marcar "+" na coluna WT do gene respectivo. Se, pelo menos uma das bandas tipo selvagem estiver ausente, classificar como negativo e marcar "-" na coluna WT do mesmo gene. Uma entrada negativa na coluna das mutações apenas se faz quando nenhuma das bandas de mutação apresenta coloração. Se, pelo menos uma das bandas de mutação apresentar coloração classificar como positiva e marcar "+" a coluna MUT do gene respectivo.

Em baixo, dois dos exemplos mostrados acima são explicados:

O exemplo 1 mostra o padrão de bandas tipo selvagem. Todas as sondas tipo selvagens apresentam sinal, mas nenhuma das sondas de mutação; por isso o gráfico de avaliação mostra um "+" nas três colunas tipo selvagem e um "-" nas três colunas de mutação. Sendo assim, as caixas para a "RMP sensitive" e "INH sensitive" são marcadas com um "+".

No exemplo 5, uma das sondas tipo selvagem do *rpoB* e do *katG* está ausente; por isso a caixa para o *rpoB* WT e *katG* WT são marcadas com um "-". Como nenhuma das sondas de mutação se desenvolveu, esta caixa também é marcada com um "-". A região promotora do *inhA* não se desvia do padrão tipo selvagem. A estirpe é avaliada como resistente ao RMP e INH.

Limitações

Siga estritamente os protocolos e procedimentos estabelecidos para obter resultados de teste correctos e evitar contaminações.

Este teste deve ser executado por pessoal bem treinado no procedimento de teste e familiarizado com métodos de biologia molecular.

Tal como qualquer teste baseado em ADN, este teste apenas pesquisa a sequência de ácidos nucleicos e não a sequência de aminoácidos. Assim, é possível que mutações na região das sondas que não provocam uma troca de aminoácidos (mutações silenciosas) possam produzir a ausência de uma ou mais sondas de tipo selvagem. Uma mutação silenciosa no codão 514 do gene *rpoB* que leva à ausência da banda *rpoB* WT3 foi observada em casos raros [10]. Deste modo, se uma resistência a RMP é detectada somente pela ausência da banda *rpoB* WT3, deviam ser considerados os resultados da determinação da resistência fenotípica.

Têm sido publicadas mutações adicionais que provocam a resistência à rifampicina dentro da região testada do gene *rpoB* [11]. Como se tratam de mutações muito raras, não estão acessíveis para processos de validação deste sistema de teste, elas foram apenas detectadas in silico.

O teste **GenoType MTBDRplus** apenas detecta as resistências que têm as suas origens nas regiões examinadas dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*. Resistências com origem em mutações em outros genes ou regiões genómicas, assim como, outros mecanismos de resistência à rifampicina e isoniazida não serão detectados por este teste.

Teoricamente, uma resistência pode existir apesar de se obter um padrão de tipo selvagem. Se, durante o estudo, a amostra tiver uma estirpe que desenvolveu uma heteroresistência, cuja resistência se deve a uma mutação não coberta pelas sondas de mutação o padrão tipo selvagem vai aparecer. Do mesmo modo, se a amostra tiver mais do que uma estirpe do complexo *M. tuberculosis* (devido à mistura de culturas ou contaminação) e uma possuir uma mutação, que não está coberta pelas sondas de mutação, o padrão tipo selvagem vai também aparecer.

Como qualquer método de detecção de ADN este sistema de teste detecta ADN de bactérias viáveis e não viáveis. Deste modo, o teste **GenoType MTBDRplus** não deve ser usado para monitorizar a progressão ou sucesso do tratamento de pacientes com terapia antimicrobiana.

O teste **GenoType MTBDRplus** gera resultados qualitativos. A intensidade de uma banda numa tira não nos informa da quantidade de células presente numa amostra positiva.

A presença de múltiplas espécies bacterianas na amostra a ser analisada pode impedir a interpretação do teste.

Os membros do complexo *M. tuberculosis* não podem ser diferenciados.

O teste funciona apenas dentro dos limites das regiões genómicas para que foram escolhidos os primers e as sondas.

Tal como qualquer sistema de detecção baseado na hibridização este sistema comporta a possibilidade de que variações de sequência das regiões genómicas para que os primers e as sondas foram escolhidas, para as quais a detecção do teste não foi desenhada, possam levar a resultados falsos. Devido à alta variabilidade dos genomas bacterianos é possível que alguns subtipos não sejam detectados. O teste reflecte o estado de conhecimento actual da Hain Lifescience.

A avaliação do desempenho deste ensaio foi realizada usando o kit **GenoLyse®** para a extração de ADN de espécimes pulmonares clínicos descontaminados com microscopia positiva e negativa assim como amostras cultivadas e usando o kit de extração **GXT DNA/RNA Extraction Kit** para a extração automática de ADN de espécimes clínicos descontaminados. Até à presente edição das instruções em seu poder, o desempenho do teste não foi validado com outros métodos de extração de ADN ou material de amostras.

Os resultados deste teste podem ser apenas interpretados em combinação com dados laboratoriais e clínicos adicionais disponibilizados ao médico responsável. Além disto, os resultados da determinação fenotípica da resistência devem ser considerados em certos casos.

O utilizador deve ter ou deve adquirir informação sobre o padrão de distribuição das mutações locais dos genes analisados com este teste. Pode ser necessário a confirmação dos resultados do teste por determinação fenotípica da resistência.

Resolução de Problemas

Sinais globalmente fracos ou inexistência de sinais (incluindo a zona do Controlo do Conjugado)

- Temperatura ambiente demasiado baixa ou reagentes não equilibrados com a temperatura ambiente.
- Ausência de, ou utilização de quantidade demasiado pequena de CON-C e/ou SUB-C.
Repetir a hibridização reversa.

Sinais fracos ou inexistência de sinais excepto na zona do Controlo do Conjugado

- A qualidade do ADN extraído não permite uma amplificação eficiente. Repita a extração.
- Misturas de Amplificação (AM-A e AM-B) foram não misturadas correctamente, trocadas, ou adicionadas nas quantidades erradas. Prepare uma nova "master mix" e repita a amplificação.
- Temperatura de incubação demasiado alta. Repetir a hibridização reversa.

Coloração não homogénea

- As tiras não foram completamente imersas durante os passos de incubação.
- A tina não foi agitada de forma apropriada.
Repetir a hibridização reversa.

Alto ruído de fundo na coloração

- CON-C e/ou SUB-C usados demasiado concentrados.
- Os passos de lavagem não foram executados com o cuidado necessário.
- Soluções de lavagem demasiado frias.
Repetir a hibridização reversa.

Resultados inesperados

- Temperatura de incubação errada.
- Tampão de Hibridização e/ou Solução de Lavagem Adstringente não pré aquecidas ou misturadas de forma apropriada.
- Contaminação de poços vizinhos por salpicos durante a adição de Tampão de Hibridização.
Repetir a hibridização reversa.
- Contaminação do ADN extraído com ADN extraído ou amplificado previamente. Repita a extração.
- Contaminação dos reagentes de amplificação. Neste caso, a amostra de controlo negativo mostra bandas adicionais para além das CC e AC. Repita a amplificação usando reagentes novos.
- Dependendo da quantidade usada de ADN amplificado e das condições específicas de reacção, pode ocorrer um desenvolvimento de cor forte e rápido. Em tais casos, pare a incubação do substrato logo que os sinais sejam claramente visíveis, de maneira a prevenir o desenvolvimento de bandas de hibridização cruzada.
- Cultura impura como material inicial. Faça novamente a cultura para excluir contaminação. Amostragem, armazenagem, transporte ou preparação impróprio dos espécimes. Solicite um novo espécime e repita o teste.
- Erro durante a extração de ADN. Repita a extração.

Materiais Necessários mas não Fornecidos

- Água (destilada)
- Água (para uso em biologia molecular, para os controlos negativos)
- Banho de água com agitação + plataforma de agitação **ou TwinCubator** (equipamento para hibridização manual) **ou** equipamento para hibridização automática
- Câmara de segurança de classe II
- Cilindro graduado
- Cronómetro
- Kit de extração de ADN (**GenoLyse®** **ou** **GXT DNA/RNA Extraction Kit**, veja capítulo Informações para Encomenda) e os equipamentos necessários
- Luvas descartáveis
- Papel absorvente
- Pinças
- Pipetas ajustáveis para 10, 20, 200, e 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis, estéreis e com filtro
- Reagentes de descontaminação da amostra assim como, equipamento necessário
- Reagentes para cultura micobacteriana assim como o equipamento necessário (quando se quer usar amostras cultivadas)
- Termociclador
- Tubos para termociclador; livres de DNases e RNases

Conteúdo do Kit

Ref. nº	304A	30496A
Testes	12	96
Componente 1 de 2 do kit (armazenar a 2-8°C)		
Tiras de membrana cobertas com sondas específicas (MTBDRplus VER 2.0 STRIPS)	12	2x 48
Solução de Desnaturação (DEN) contém <2% NaOH, corante	0,3 ml	2x 1,2 ml
Tampão de Hibridização (HYB) contém <10% de tensoactivos aniónicos, corante	20 ml	120 ml
Solução de Lavagem Adstringente (STR) contém >25% de um composto de amónio quaternário, <1% de tensoactivos aniónicos, corante	20 ml	120 ml
Solução Rinse (RIN) contém tampão, <1% NaCl, <1% tensoactivos aniónicos	50 ml	3x 120 ml
Conjugado Concentrado (CON-C) contém o conjugado streptavidina – fosfatase alcalina, corante	0,2 ml	1,2 ml
Tampão do Conjugado (CON-D) contém tampão, 1% de reagente bloqueador, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrato Concentrado (SUB-C) contém <70% dimetilsulfoxido, <10% cloreto de 4-nitro azul de tetrazólio, <10% 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	0,2 ml	1,2 ml
Tampão do Substrato (SUB-D) contém tampão, <1% NaCl, <1% MgCl ₂	20 ml	120 ml
Tina, ficha de avaliação	1 de cada	4 de cada
Instruções de uso, modelo	1 de cada	1 de cada

Componente 2 de 2 do kit

 (armazenar a -20°C)

Mistura de Amplificação A (AM-A GT MTBDRplus VER 2.0) contém tampão, nucleótidos, Taq polimerase	0,15 ml	4x 0,3 ml
Mistura de Amplificação B (AM-B GT MTBDRplus VER 2.0) contém sais, primers específicos, corante	0,53 ml	4x 1,05 m

Informações para Encomenda

	Ref. nº
GenoType MTBDRplus VER 2.0 (kit para análise de 12 amostras)	304A
GenoType MTBDRplus VER 2.0 (kit para análise de 96 amostras)	30496A
GenoType MTBDRplus VER 2.0 e GenoLyse [®] (kit para análise de 12 amostras e kit de extracção manual de ADN para 12 amostras)	304AM
GenoType MTBDRplus VER 2.0 e GenoLyse [®] (kit para análise de 96 amostras e kit de extracção manual de ADN para 96 amostras)	30496AM
GenoType MTBDRplus VER 2.0 e GXT DNA/RNA Extraction Kit (kit para análise de 96 amostras e kit de extracção automática de ADN para 96 amostras utilizando o GenoXtract [®])	30496AA
GenoLyse [®] (kit de extracção manual de ADN para 12 amostras)	51612
GenoLyse [®] (kit de extracção manual de ADN para 96 amostras)	51610
GXT DNA/RNA Extraction Kit (kit de extracção automática de ADN/ARN para 96 amostras utilizando o GenoXtract [®])	12.01.02
GenoXtract [®] (equipamento de extracção de ADN; até 12 amostras)	8.31.01

Performance Characteristics

Diagnostic performance

Pulmonary clinical specimens

Diagnostic performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 were determined in a study [12] with 338 specimens (including sputum, bronchoalveolar lavages, and pleural aspirates) compared to culture (successful cultivation on Loewenstein-Jensen solid medium or in MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) and subsequent speciation using the **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0) and phenotypic drug susceptibility testing (DST). Additionally, the samples were examined by microscopy. Clinical data of the patients were included in the evaluation.

The study site was located in a high MDR-TB burden country. Microscopy and cultivation methods were conducted on site. Aliquots of the NALC-decontaminated sputum specimens were shipped to a second laboratory to perform DNA extraction and the **GenoType MTBDRplus**. Manual DNA extraction was performed with the **GenoLyse**® kit (162 of the 338 sputum samples), automated DNA extraction was carried out on the **GenoExtract**® instrument using the **GXT DNA/RNA Extraction Kit** (176 of the 338 sputum samples) according to the respective instructions for use.

A congruent **GenoType MTBDRplus** positive, clinical positive result was defined either by positivity of culture and **GenoType MTBDRplus** or when only **GenoType MTBDRplus** was positive and culture negative, but TB was indicated by previous culture-based findings of the respective patient. A discrepant result (**GenoType MTBDRplus** positive and culture negative) does not exclude in all cases a TB infection of the patient as for some patients' histories of a probable TB infection were not available.

Table 1: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** for detection of MTBC from pulmonary clinical specimens compared to culture/**GenoType Mycobacterium CM** (GT Myco CM) and clinical findings

		Smear-positive		Sens: 100% Spec: /* PPV: 100% NPV: /*	Smear-negative		Sens: 80.3% Spec: 98.4% PPV: 98.0% NPV: 83.3%	
		Culture/GT Myco CM and clinic			Culture/GT Myco CM and clinic			
		Positive	Negative		Positive	Negative		
GenoLyse ®	GenoType MTBDRplus	Positive	39	0		49	1	
		Negative	0	1		12	60	
GXT	GenoType MTBDRplus	Positive	39	1	Sens: 97.5% Spec: /* PPV: 97.5% NPV: /*	47	3	Sens: 78.3% Spec: 96.0% PPV: 94.0% NPV: 84.7%
		Negative	1	0		13	72	

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

* no value due to low sample number

For evaluation of resistance detection, the 156 samples (78 **GenoLyse**® isolates and 78 **GXT** isolates) were used which were MTBC-positive in both culture and **GenoType MTBDRplus**.

Table 2: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** for detection of RMP resistance from pulmonary clinical specimens compared to culture/DST

		Smear-positive		Sens: 100% Spec: 92.3% PPV: 96.2% NPV: 100%	Smear-negative		Sens: 96.0% Spec: 93.3% PPV: 96.0% NPV: 93.3%	
		Culture/DST			Culture/DST			
		RMP-R	RMP-S		RMP-R	RMP-S		
GenoLyse ®	GenoType MTBDRplus	RMP-R	25	1		24	1	
		RMP-S	0	12		1	14	
GXT	GenoType MTBDRplus	RMP-R	26	0	Sens: 96.3% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 92.3%	25	0	Sens: 86.2% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 71.4%
		RMP-S	1	12		4	10	

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;

RMP-R, resistant to rifampicin; RMP-S, sensitive to rifampicin

Table 3: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** for detection of INH resistance from pulmonary clinical specimens compared to culture/DST

		Smear-positive		Sens: 96.7% Spec: 87.5% PPV: 96.7% NPV: 87.5%	Smear-negative		Sens: 96.7% Spec: 90.0% PPV: 96.6% NPV: 90.0%	
		Culture/DST			Culture/DST			
		INH-R	INH-S		INH-R	INH-S		
GenoLyse ®	GenoType MTBDRplus	INH-R	29	1		29	1	
		INH-S	1	7		1	9	
GXT	GenoType MTBDRplus	INH-R	28	0	Sens: 100% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 100%	29	2	Sens: 90.6% Spec: 71.4% PPV: 93.5% NPV: 62.5%
		INH-S	0	11		3	5	

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;

INH-R, resistant to isoniazid; INH-S, sensitive to isoniazid

Cultured material

The diagnostic performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** were determined in a study with 74 cultured samples compared to **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 and phenotypic drug susceptibility testing (DST). The study site was located in a low MDR-TB burden country. Manual DNA extraction was performed using the **GenoLyse**[®] kit according to the instructions for use. From 74 cultures, 49 were positive for *M. tuberculosis* complex (MTBC) and 25 cultures showed growth of nontuberculous mycobacteria. Hence, for resistance detection in cultured material, 49 isolates were available.

Table 4: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** for detection of MTBC from cultured material compared to culture/**GenoType Mycobacterium CM** (GT Myco CM)

	Culture/GT Myco CM		Sens: 100%	
	Positive	Negative		Spec: 100%
GenoType MTBDRplus	Positive	49	0	PPV: 100%
	Negative	0	25	NPV: 100%

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

Table 5: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** for detection of RMP resistance from cultured material compared to culture/DST

	Culture/DST		Sens: /*	
	RMP-R	RMP-S		Spec: 100%
GenoType MTBDRplus	RMP-R	0	0	PPV: /*
	RMP-S	0	49	NPV: 100%

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; RMP-R, resistant to rifampicin; RMP-S, sensitive to rifampicin

* no value due to low sample number

Table 6: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** for detection of INH resistance from cultured material compared to culture/DST

	Culture/DST		Sens: /*	
	INH-R	INH-S		Spec: 100%
GenoType MTBDRplus	INH-R	3	0	PPV: /*
	INH-S	0	46	NPV: 100%

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; INH-R, resistant to isoniazid; INH-S, sensitive to isoniazid

* no value due to low sample number

Analytical performance

Analytical specificity

The specificity of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 is ensured by the accurate design of specific primers and probes which considers, among others, homology comparisons of the sequences published in gene databases, and by stringent reaction conditions.

The analytical specificity was determined with 61 DNA isolates including the following MTBC strains: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, and *M. pinnipedii* (all RMP- and INH-sensitive). The following strains not detectable with the test system were analyzed: *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *C. bovis*, *C. durum*, *Escherichia coli*, *Gordona rubropertinctus*, *Klebsiella oxytoca*, *Mycobacterium abscessus*, *M. alvei*, *M. asiaticum*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. chimaera*, *M. fortuitum* (2 sequevars), *M. frederiksbergense*, *M. gastri*, *M. genavense*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. heckeshornense*, *M. immunogenum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. intracellulare*, *M. lentiflavum*, *M. marinum*, *M. mucogenicum*, *M. palustre*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triplex*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, MRSA, *Nocardia abscessus*, *N. africana*, *N. amarae*, *N. asteroides*, *N. farcinica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Rhodococcus erythropolis*, *Saccharomonospora glauca*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Tsukamurella inchonensis*, *T. pulmonis*.

The six MTBC isolates were correctly identified as RMP- and INH-sensitive MTBC strains. All other 55 isolates displayed no TUB band and no evaluable band pattern for RMP and INH resistances. Hence, an analytical specificity of 100% was achieved.

Analytical sensitivity

For determination of analytical sensitivity of the **GenoType MTBDRplus** for clinical samples, ten parallel BCG cultures were diluted and spiked into MTBC-negative sputum samples (final concentrations in sputum samples: 1000, 500, 160, and 100 bacteria/ml). Including a negative control, DNA was extracted once using the **GenoLyse**[®] kit and once using the **GXT DNA/RNA Extraction Kit**, and analyzed with the **GenoType MTBDRplus** applying the "MDR DIR" PCR protocol. A limit of detection of 160 bacteria/ml was determined with both extraction methods.

For determination of analytical sensitivity of the **GenoType MTBDRplus** for culture samples, four BCG cultures (RMP- and INH-sensitive, 1.6×10^4 , 1.6×10^3 , 1.6×10^2 , and 100 bacteria/ml) were set up in triplicate. Including a negative control, DNA was extracted using the **GenoLyse**[®] kit and analyzed with the **GenoType MTBDRplus** applying the "MDR CUL" PCR protocol. A limit of detection of 1.6×10^4 bacteria/ml was determined.

Reproducibility

Intra-assay precision

In order to determine the intra-assay precision of the **GenoType MTBDRplus**, two BCG cultures (RMP- and INH-sensitive, 1,500 and 150 bacteria/ml) and an *M. avium* culture (10,000 bacteria/ml) were set up in triplicate and spiked into negative sputum specimens. These samples and a negative control were tested with the **GenoType MTBDRplus** under identical conditions, applying the "MDR DIR" PCR protocol. DNA extraction was performed once using the **GenoLyse**[®] DNA extraction kit, and once using the **GXT DNA/RNA Extraction Kit**. All parallels showed identical and correct banding patterns and comparable signal strengths. Additionally, signal strengths between the two DNA extraction methods and between different dilutions of the same samples were comparable. Hence, an intra-assay precision of 100% was achieved.

Inter-assay precision

In order to determine the inter-assay precision of the **GenoType MTBDRplus**, two BCG cultures (RMP- and INH-sensitive, 1,500 and 150 bacteria/ml) and an *M. avium* culture (10,000 bacteria/ml) were set up in triplicate and spiked into negative sputum specimens. These samples and a negative control were tested in nine runs: on three different days, using three different sets of instruments, and conducted by three different operators. DNA extraction was performed once using the **GenoLyse**® DNA extraction kit and once using the **GXT DNA/RNA Extraction Kit**. The "MDR DIR" PCR protocol was applied for PCR. Apart from the varied parameter, all other testing conditions were identical. No deviations were detected between parallel samples, that is between runs banding patterns were identical and correct and signal strengths were comparable. Moreover, signal strengths were comparable between different DNA extraction methods and different bacterial concentrations. Hence, the inter-assay precision was 100%.

Interfering substances

There are substances that may inhibit PCR reactions. Such inhibitors may, for example, originate from the culture medium. In order to assess if the medium influences the **GenoType MTBDRplus**, 6 different *M. tuberculosis* complex samples (4 RMP- and INH-resistant, 2 RMP- and INH-sensitive) were cultured in 4 different media (solid media: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, and Middlebrook-7H10, liquid medium: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). DNA was extracted from the culture samples using the **GenoLyse**® DNA extraction kit and then tested with the **GenoType MTBDRplus**.

All *M. tuberculosis* complex samples showed the same correct results. Hence, it can be excluded that the tested media import inhibitors into the **GenoType MTBDRplus** test.

Interfering substances may also be carried over from the sample material. Hence, the substances indicated in table 7 were tested in order to assess a potential interference of the **GenoType MTBDRplus**. Defined BCG culture dilutions above and at the detection limit were spiked with various amounts of the potential inhibitors. From all samples, DNA extraction was performed using the **GenoLyse**® DNA extraction kit. Then the culture dilutions were tested with the **GenoType MTBDRplus**.

Table 7: Tested potential interferents of the **GenoType MTBDRplus**

Substance/class	Description/active ingredient	Test concentration(s)
Allergy relief medicines	Tea tree oil	0.008 % v/v to 0.5 % v/v
Anesthetics (endotracheal intubation)	Lidocaine HCl 4%	20% v/v; 30% v/v
Anesthetics (oral)	Benzocaine 20%	5% w/v
Antibiotics (nasal ointment)	Mupirocin	1.2 mg/ml; 2.4 mg/ml
Antibiotics (systemic)	Amoxicillin	2.2 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Isoniazid 1 mg/ml	50 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Rifampicin 1 mg/ml	25 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Pyrazinamide 10 mg/ml	100 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Ethambutol 1 mg/ml	5 µg/ml; 50 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Streptomycin 1 mg/ml	25 µg/ml
Anti-viral drugs	Zanamivir	800 µg/ml
Blood	Whole blood	0.2% v/v to 5% v/v
Blood	Hemoglobin	0.05% v/v to 0.3% v/v
Bronchodilators	Theophylline	222 pmol/ml
DNA (human)		10 µg/ml
Expectorants (oral)	Guaifenesin 400 mg/pill	2.5 mg/ml; 5 mg/ml
Gastric acid	0.5% HCl, 0.1 M KCl, 0.1 M NaCl, pH 1-2	5% v/v
Influenza vaccine as nasal spray (FluMist®)	Live attenuated influenza vaccine	5% v/v
Inhaled bronchodilators	Salbutamol sulfate 2.5 mg/3 ml	50 µg/ml; 100 µg/ml
Mouthwash/gargle solutions	Listerine (eucalyptol 0.029%, menthol 0.042%, methyl-salicylate 0.06%, thymol 0.064%, denatured alcohol 20%)	20% v/v
Mucin: bovine submaxillary gland, type I-S	Purified mucin protein 5% w/v	1.5% w/v; 5% w/v
Nasal corticosteroids	Dexamethasone	1.52 pmol/ml
Nasal gel (homeopathic)	Sulfur	5% w/v
Nasal sprays or drops	Phenylephrine 0.5%	25% v/v; 100% v/v
Nebulizing solutions (hypertonic saline)	NaCl	3% w/v; 5% w/v
Physiologic saline	NaCl (0.9%)	0.9% w/v
<i>Pneumocystis jiroveci</i> medications	Pentamidine	300 ng/ml
Pus		0.2% v/v to 5% v/v
Specimen processing reagents	NALC-NaOH (N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide)	0.5% v/v; 1% v/v
Tobacco	Nicogel (40% tobacco extract)	0.5% w/v

Inhibition of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 (invalid test result) was observed in the presence of the following substances in the concentrations as indicated: whole blood at 0.6%, hemoglobin at 0.1%, pus at 2%, lidocaine at 30%, mupirocin at 2.4 mg/ml, tea tree oil at 0.5%, and guaifenesin at 5 mg/ml.

Stability

Shelf life of the **GenoType MTBDRplus** test kit when stored as recommended: see box label.

Stability is determined according to DIN EN ISO 23640.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2014.
2. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 1320–1330.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
4. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).
5. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1985.
6. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA 1992.
7. Richter E, Beer J, Diel R, Hillemann D, Hoffmann H, Klotz M, Mauch H, Rüsche-Gerdes S. MiQ 5, Tuberkulose, Mykobakteriose. In: Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, Mauch H, Rüssmann H (eds): Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards. Elsevier, Munich, Germany 2010.
8. DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. (ed). DIN 58943-4:2009-02: Medical microbiology - Diagnosis of tuberculosis - Part 4: Primary samples for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteria – Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage. Beuth, Berlin, Germany 2009.
9. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993, 341: 647-650.
10. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E, García de Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2688-2690.
11. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 496-514.
12. Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as RMP and INH resistances. *J Clin Microbiol* 2012; Epub ahead of print, doi:10.1128/JCM.05903-11.

Important Changes in IFU-304A-06

Chapter	Change
Precautions for Handling Kit Constituents	Classification of the kit reagents according to GHS criteria [Regulation (EC) No. 1272/2008]



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0