

**TESTE AMPLIFIED PARA A DETECÇÃO DIRECTA DAS MICOBACTÉRIAS
DO COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS****Embalagem de 50 testes**

(bioMérieux ref. 39006/Hologic Cat. No. 301001F)

UTILIZAÇÃO	2
ADVERTÊNCIA	2
PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO	2
INTRODUÇÃO.....	4
PRINCÍPIO	5
REAGENTES (Embalagem de 50 testes).....	5
CONSERVAÇÃO.....	6
COLHEITA/COLETA, CONSERVAÇÃO, TRANSPORTE E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS.....	7
Colheita/coleta e conservação da amostra	7
Transporte.....	7
Tratamento (descontaminação e concentração)	7
Conservação das amostras tratadas	7
MATERIAL	7
PROCEDIMENTO.....	9
Controlos.....	9
Preparação do material	11
Preparação do reagente.....	12
Preparação das amostras	12
Lise das amostras	13
Amplificação	13
Hibridização	14
Seleccção	15
Detecção.....	15
Repetição do teste.....	15
NOTAS	15
INTERPRETAÇÃO DO TESTE	17
APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	17
LIMITES.....	18
VALORES ESPERADOS	19
COMPORTAMENTO FUNCIONAL	20
RESOLUÇÃO DE INCIDENTES	24
NOTAS	26
BIBLIOGRAFIA	27

UTILIZAÇÃO

O teste Hologic AMPLIFIED PARA A DETECÇÃO DIRECTA DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (MTD™) é um teste que utiliza uma sonda de ácido nucleico dirigida contra um alvo amplificado, permitindo a detecção *in vitro* dos ácidos nucleicos das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Este teste efectua-se a partir de amostras provenientes de expectorações (induzidas ou expectoradas), de colheitas/coletas brônquicas (lavagens bronco-alveolares ou aspirações brônquicas) ou de aspirações traqueais.

ADVERTÊNCIA

A eficácia deste teste não foi demonstrada para a detecção directa de ARNr de *M. tuberculosis* a partir de outras amostras clínicas (sangue, urina ou fezes, por exemplo). O comportamento funcional do teste MTD foi estudada apenas para as amostras tratadas com a técnica descrita e conservadas respeitando o tempo e temperaturas especificadas nesta ficha técnica.

As amostras que derem resultados positivos devem ser colocadas em cultura para determinar a presença eventual de micobactérias atípicas juntamente com as do complexo *M. tuberculosis* permitindo efectuar testes de sensibilidade aos agentes anti-micobacterianos. Devem ser efectuadas culturas para a detecção de bacilos ácido-álcool-resistentes (BAAR) para precisar que tipo de sub-espécie do complexo *M. tuberculosis* está presente (*M. bovis*, por exemplo).

No decurso de ensaios clínicos, foram submetidas ao teste amostras provenientes de crianças, de pacientes VIH-positivos e de pacientes infectados com micobactérias atípicas. No entanto, o número destes ensaios não permitiu comparar estatisticamente o comportamento funcional do teste para estes diferentes grupos.

O comportamento funcional do teste em amostras provenientes de pacientes sob tratamento anti-tuberculose, no intuito de efectuar um seguimento terapêutico ou de confirmar uma cura, não foi avaliada.

As amostras com muito sangue não devem ser analisadas com o dispositivo MTD.

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- A. Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.
- B. O teste MTD é específico para as micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, ou seja, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, e *M. canetti* (13), mas não as diferencia. *M. celatum* e *M. tipo-terrae* podem provocar reacções cruzadas se estiverem presentes concentrações superiores a 30 UFC (Unidades Formadoras de Colónias) por teste. No entanto, *M. celatum* e *M. tipo-terrae* são raramente isoladas em clínica.
- C. Um resultado negativo não exclui a presença de uma micobactéria do complexo *M. tuberculosis* na amostra. A qualidade dos resultados está ligada à qualidade da colheita e do seu transporte, à variabilidade das colheitas/coleta, aos erros técnicos do

laboratório, aos erros de identificação das amostras e aos erros de transcrição dos resultados.

- D. O teste destina-se apenas à detecção das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, a partir de amostras preparadas segundo os métodos NALC-NaOH ou NaOH que são recomendados pelos Centers for Disease Control (CDC)⁷. Este teste deve ser utilizado unicamente para amostras concentradas, preparadas a partir de expectorações (induzidas ou expectoradas), de aspirações traqueais ou de colheitas/coleta brônquicas (lavagens bronco-alveolares ou aspirações brônquicas). Quando proceder à suspensão da amostra na solução de tampão fosfato, verificar se a concentração de fosfato é de 67 mM⁷.
- E. Evitar qualquer contacto dos Reagentes de Detecção I e II (bioMérieux ref. 39300 / Cat. No. 201791) com a pele, olhos ou mucosas. Caso haja contacto, lavar com água. Se estes reagentes forem entornados, diluí-los com água antes de limpar.
- F. Ter as precauções habituais na realização deste teste⁴. A preparação das amostras fluidificadas e descontaminadas, bem como as etapas do teste MTD, devem ser efectuadas respeitando as regras de segurança microbiológica do nível 2⁵.
- G. Utilizar unicamente o material fornecido ou material de laboratório de utilização única.
- H. As bancadas, pipetas e material devem ser descontaminados com uma solução de lixívia diluída a 1/2 (metade de lixívia, metade de água), como descrito no parágrafo «PROCEDIMENTO». Deixar a lixívia actuar durante 15 minutos, depois lavar com água e enxugar para eliminar traços de lixívia.
- I. Devem ser utilizadas “as pipetas da bancada de trabalho ou as pipetas da câmara de fluxo laminar” equipadas de pontas com filtro para efectuar este teste. Devem utilizar-se pontas extra-longas para transferir o lisado dos tubos de lise para os tubos de amplificação. Mudar de ponta em cada etapa. Evitar passar por cima dos outros tubos do suporte. As pontas usadas devem ser imediatamente deitadas num recipiente destinado aos detritos biológicos.
- J. Quando utilizar uma pipeta de repetição para a distribuição dos reagentes, depois da introdução do lisado nos tubos, evitar tocar no tubo com a ponta da pipeta para reduzir os riscos de contaminação entre tubos. Os reagentes devem ser distribuídos contra a parede do tubo para evitar projecções. O cuidado na distribuição dos reagentes permitirá reduzir os riscos de contaminação cruzada.
- K. Não utilizar as mesmas pipetas para as etapas anteriores e posteriores à amplificação.
- L. Depois da leitura dos resultados no luminómetro, descontaminar os tubos e eliminá-los como descrito nos parágrafos «PROCEDIMENTO» e «NOTAS» para evitar a contaminação do laboratório com amplicons.
- M. NUNCA usar novamente as folhas autocolantes e as tampas utilizadas durante uma etapa anterior. As tampas devem ser eliminadas num recipiente apropriado, imediatamente após tê-las retirado, para evitar qualquer contaminação cruzada. As folhas autocolantes devem ser aplicadas firmemente no cimo dos tubos reaccionais.

- N. Não cobrir o banho-maria durante as incubações, especialmente se as tampas forem utilizadas (a condensação na tampa pode ser uma fonte de contaminação).
- O. É necessário efectuar uma boa homogeneização em Vortex depois da adição do Reagentes de Selecção para obter resultados precisos.
- P. É recomendado utilizar uma área separada para a etapa de Ensaio de Protecção de Hibridização (HPA / Hybridization Protection Assay) para minimizar a contaminação por amplicons no ensaio. Esta área deve estar separada da área onde é efectuada a preparação da amostra, a preparação do reagente e a amplificação.
- Q. Para evitar que as áreas do laboratório fiquem contaminadas por amplicons, o laboratório deve estar organizado de uma forma uni-direccional de trabalho. Por exemplo, efectuar em primeiro lugar a preparação da amostra e do reagente numa área, em seguida a amplificação noutra, e por último o HPA noutra área. As amostras, equipamento e reagentes não devem voltar para a área onde foi efectuada uma etapa anterior. Além disso, o pessoal de laboratório não deve voltar para uma área de trabalho anterior sem ter as devidas precauções de anti-contaminação. É vivamente recomendado que a área de segurança biológica usada para o processamento da amostra não seja usada para efectuar o teste MTD.

INTRODUÇÃO

O teste MTD utiliza os métodos TMA (Transcription-Mediated Amplification) e HPA (Hybridization Protection Assay)² para detectar qualitativamente o ARN ribossómico (ARNr) das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. O teste MTD detecta o ARN dos organismos cultiváveis e não cultiváveis. O complexo *M. tuberculosis* é constituído pelas sub-espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti*^{12,13}. O teste MTD detecta todos os microrganismos do complexo *M. tuberculosis*. No entanto, *M. microti* infecta apenas os animais e *M. bovis* raramente se transmite dos animais para o homem. *M. africanum* é responsável pela tuberculose pulmonar na África Tropical¹². *M. tuberculosis* é, de longe, o mais comum, sendo responsável por uma morbidez significativa no mundo inteiro. O CDC relatou, recentemente, um aumento dos casos de tuberculose nos pacientes atingidos com SIDA e nos imigrantes, e um aumento da transmissão da doença nas populações de alto risco^{6,9}. Observa-se igualmente o aumento de número de estirpes/cepas resistentes, ou seja, multi-resistentes aos anti-tuberculostáticos¹¹. As consequências são consideráveis no domínio da saúde pública.

Os métodos de cultura convencionais permitem observar o crescimento de *M. tuberculosis* num prazo de 1 a 8 semanas^{7,10}. O teste MTD permite a detecção do ARNr das micobactérias do complexo *M. tuberculosis* em 2,5 a 3,5 horas. Mesmo não permitindo efectuar o antibiograma, o teste MTD detecta o *M. tuberculosis* fiável e rapidamente. Isto permite uma melhor utilização dos serviços de isolamento dos hospitais, começar rapidamente um tratamento apropriado e prevenir a propagação da doença graças à identificação precoce e ao isolamento das pessoas contaminadas³.

PRINCÍPIO

O teste MTD é um teste em duas fases (amplificação e detecção) que se efectuam no mesmo tubo. Primeiro, a sonicação provoca a libertação dos ácidos nucleicos das micobactérias. O calor é utilizado para desnaturar estes ácidos nucleicos e romper a estrutura secundária do ARNr. O método de amplificação Transcription-Mediated Amplification (TMA) amplifica em seguida um alvo específico do ARNr micobacteriano através de um intermediário de ADN, a uma temperatura constante de 42°C. Produzem-se assim múltiplas cópias de ARNr micobacteriano (amplicons).

As sequências de amplicons de ARNr, específicas das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, são detectadas em seguida pelo método de hibridização entre ácidos nucleicos Hibridization Protection Assay (HPA)², da . O Reagente de Hibridização do teste MTD contém uma sonda ADN monocatenária conjugada com um marcador quimioluminescente. Esta sonda é complementar das sequências de ARN específicas das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. A sonda forma, com estas sequências específicas, híbridos estáveis ARN:ADN. Após a etapa de selecção, o sinal luminoso emitido pelas sondas hibridizadas é medido no luminómetro Leader.

REAGENTES (Embalagem de 50 testes)

Nota: Para obter informações sobre quaisquer declarações de perigo e de precaução que possam estar associadas a estes reagentes, consulte a Biblioteca de fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet Library) em www.hologic.com/sds.

Os reagentes para o teste MTD são fornecidos como segue:

EMBALAGEM DE REAGENTES PARA AMPLIFICAÇÃO

Nome do reagente	Volume
Tampão de Diluição das Amostras (SDB) <i>Solução Tampão Tris contendo < 3 % de detergente</i>	1 x 2,5 ml
Reagente de Amplificação (A) <i>Ácidos nucleicos liofilizados numa solução tampão Tris contendo 5 % de agente espessante</i>	1 x 3 ml (após reconstituição)
Tampão de amplificação (AB) <i>Solução aquosa contendo conservantes</i>	1 x 3 ml
Reagente óleo de amplificação (óleo para reacção de amplificação) (O) <i>Óleo de silicone</i>	1 x 10 ml
Reagente Enzimático (E) <i>Transcriptase inversa e ARN polimerase liofilizadas numa solução (após reconstituição) tampão HEPES contendo < 10 % de agente espessante e ≥ 15 mM de N-Acetil-L-Cisteína</i>	1 x 1,5 ml (após reconstituição)
Tampão de Diluição Enzimática (tampão de diluição das enzimas) (EDB) <i>Solução tampão Tris contendo um surfactante e glicerol</i>	1 x 1,5 ml

EMBALAGEM DE REAGENTES PARA A HIBRIDIZAÇÃO

Nome do reagente	Volume
Reagente de Hibridização (H) <i>< 100 ng/frasco de sonda ADN não infecciosa conjugada com um marcador quimioluminescente, liofilizado numa solução tampão succinato contendo um agente espessante e um detergente</i>	1 x 6 ml (após reconstituição)
Tampão de Hibridização (HB) <i>Solução tampão succinato contendo < 4 % de detergente</i>	1 x 6 ml
Reagente de Selecção (S) <i>Solução tampão borato contendo um surfactante</i>	1 x 15 ml
Tubos de Lise (LT) <i>Esferas de vidro, agente espessante</i>	2 x 25 tubos

CONSERVAÇÃO

A. As soluções ou os componentes não reconstituídos seguintes devem ser conservados a 2°C- 8°C e são utilizáveis até à data de validade indicada:

- Tampão de Diluição das Amostras (SDB)
- Reagente de Amplificação (A)
- Tampão de Amplificação (AB)
- Reagente Enzimático (E)
- Tampão de Diluição Enzimática (EDB)
- Reagente de Hibridização (H)

O Reagente de Amplificação reconstituído (A) é utilizável durante 2 meses e conserva-se a 2°C - 8°C. O Reagente de Hibridização (H) e o Reagente Enzimático (E) são utilizáveis um mês a 2°C- 8°C após reconstituição, ou dois meses a uma temperatura igual ou inferior a -20°C, se forem distribuídos em alíquotas e congelados no dia da reconstituição. As alíquotas congeladas devem ser utilizadas no próprio dia da descongelação. Não utilizar congelador com descongelação automática.

B. Os componentes que se seguem devem ser conservados entre 2°C e 25°C e são utilizáveis até à data de validade indicada:

- Reagente óleo de amplificação (O)
- Tampão de Hibridização (HB)
- Reagente de Selecção (S)
- Tubos de Lise (LT)

COLHEITA/COLETA, CONSERVAÇÃO, TRANSPORTE E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Colheita/coleta e conservação da amostra

As amostras devem ser colocadas em recipientes de plástico estéreis e conservadas a 2°C - 8°C antes do seu transporte e tratamento. No decurso dos ensaios clínicos, as amostras foram conservadas menos de 4 dias (geralmente, menos de 24 horas) antes do seu tratamento.

Transporte

Transportar as amostras para o laboratório o mais rapidamente possível, em conformidade com as regulamentações em vigor.

Tratamento (descontaminação e concentração)

As amostras com muito sangue não devem ser testadas com MTD. Este teste foi concebido para detectar o ARNr das micobactérias do complexo *M. tuberculosis* utilizando amostras preparadas segundo os métodos de descontaminação NALC-NaOH ou NaOH utilizando 1% a 1,5% de NaOH durante 15 a 20 minutos e uma centrifugação com uma velocidade $\geq 3\ 000\ g^7$.

Conservação das amostras tratadas

As amostras podem ser conservadas, no máximo, durante 3 dias a 2°C - 8°C antes do teste. Podem também conservar-se entre -20°C e -70°C durante 6 meses ou mais. Não utilizar congeladores com descongelação automática.

MATERIAL

A. Material fornecido

EMBALAGEM DE REAGENTES PARA AMPLIFICAÇÃO

Composição da embalagem (bioMérieux ref. 39006 / Hologic Cat. No. 301001F)	50 testes
Tampão de Diluição das Amostras (SDB)	1 x 2,5 ml
Reagente de Amplificação (A)	1 x 3 ml (após reconstituição)
Tampão de Reconstituição (AB)	1 x 3 ml
Reagente de óleo (óleo para reacção de amplificação) (O)	1 x 10 ml
Reagente Enzimático (E)	1 x 1,5 ml (após reconstituição)
Tampão de Diluição Enzimática (EDB)	1 x 1,5 ml

EMBALAGEM DE REAGENTES PARA HIBRIDIZAÇÃO

Composição da embalagem (bioMérieux ref. 39006 / Hologic Cat. No. 301001F)	50 Test
Reagente de Hibridização (H)	1 x 6 ml (após reconstituição)
Tampão de Hibridização (HB)	1 x 6 ml
Reagente de Selecção (S)	1 x 15 ml
Tubos de Lise (LT)	2 x 25 tubos
Cartas de protecção (folhas autocolantes)	1 pacote

B. Material necessário não fornecido:

- Micropipetas capazes de distribuir 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl e 450 µl
- Vortex
- Água estéril (filtrada ou autoclavada) Tubos de cultura
- Esferas de vidro estéreis de 3 mm
- Tubos para microcentrífuga com tampas de enroscar
- Suporte para tubos reaccionais
- Pontas de pipeta com filtro (1 000 µl)
- Testemunhos Positivos de Amplificação (por ex. *M. tuberculosis*, ATCC 25177 ou ATCC 27294)
- Testemunhos Negativos de Amplificação (por ex. *M. gordonae*, ATCC 14470 ou *M. terrae*, ATCC 15755)
- Lixívia (solução de hipoclorito a 5,25%)
- Folhas de protecção plastificadas para bancada
- Pipetas de repetição

C. Material suplementar disponível no distribuidor Hologic:

	<u>Cat. No.</u>
Sonicador (<i>bioMérieux ref. 39409</i>)	901104
Blocos de aquecimento ^A (42°C ± 1°C, 60°C ± 1°C, 95°C ± 5°C) (<i>bioMérieux ref. 39405, 39406, 39407</i>)	105524, 10554F, 105524J
Luminómetro Leader 50i (<i>bioMérieux ref. 39400</i>)	103100i
Embalagem de Reagente de Detecção (<i>bioMérieux ref. 39300</i>)	201791
Controlos de Amplificação MTD (<i>bioMérieux ref. 39223</i>)	301043F
Suporte de tubos para o sonicador (<i>bioMérieux ref. 39313</i>)	104027
Suporte de tubos reaccionais (<i>bioMérieux ref. 39311</i>)	104769
Pontas de pipeta longas com filtro (1250 µl) (<i>bioMérieux ref. 39315</i>)	104316
Tubos em polipropileno, 12 x 75 mm (<i>bioMérieux ref. 39308</i>)	102440
Tampas em polipropileno para tubos de 12 x 75 mm (<i>bioMérieux ref. 39320</i>)	400713

PROCEDIMENTO**Controlos**

As células usadas para o Controlo de Amplificação Positivo devem fazer parte do complexo *M. tuberculosis*, tal como a H37Ra não-virulenta (ATCC 25177) ou a H37Rv virulenta (ATCC 27294). As células usadas para o Controlo Negativo devem ser MOTT, tal como *M. gordonae* (ATCC 14470) ou *M. terrae* (ATCC 15755). Os controlos devem ser preparados antes de efectuar o teste da amostra.

Os controlos devem conter 25 – 150 CFU por 50 µl para obter uma concentração final de 1 – 10 CFU por amostra. Esta concentração deve ser verificada em cultura. Estes controlos devem ser utilizados na preparação dos Controlos de Processamento da Amostra (consultar a Preparação da Amostra).

1. Preparação recomendada para os Controlos
 - a. Colocar 3 a 5 esferas de vidro de 3 mm num tubo de cultura limpo.
 - b. Adicionar 1 a 2 ml de água estéril. Adicionar o conteúdo de várias ansas (1 µl) de cultura apropriada. Fechar o tubo e agitar várias vezes a uma grande velocidade, utilizando um Vortex.
 - c. Deixar repousar durante 15 minutos.
 - d. Transferir o sobrenadante para um tubo de cultura limpo. Ajustar a turbidez a 1 McFarland utilizando um nefelómetro.
 - e. Diluir a 1/100 a suspensão, colocando 100 µl da suspensão a 1 McFarland em 10 ml de água estéril. Fechar e agitar em vortex. Esta é a primeira diluição.
 - f. Diluir uma segunda vez a 1/100, colocando 100 µl da diluição 1 em 10 ml de água estéril. Fechar e agitar em vortex. Esta é a segunda diluição. Esta diluição deve conter aproximadamente 25 – 150 CFU por 50 µl.

Aliquotar e Conservar os Controlos

- a. As diluições devem ser distribuídas em alíquotas (500 µl), em micro-tubos de centrifuga de 1,5 ml limpos, com tampas de rosca. As alíquotas destinam-se a uma única utilização e podem ser conservadas a –20° C durante 6 meses ou a –70° C durante 1 ano. Não utilizar congelador com descongelação automática.

A utilização do controlo positivo para *M. tuberculosis* servirá para monitorizar apenas a falha substancial do reagente. O controlo positivo foi concebido para verificar se houve excesso de NaOH e de tampão fosfato nos reagentes utilizados durante o procedimento. As variações dos procedimentos no tempo ou nas temperaturas que podem afectar a eficiência da amplificação ou a exactidão do tempo seleccionado podem não ser detectadas utilizando os controlos recomendados. Os controlos adicionais podem ser testados em conformidade com as directivas ou recomendações especiais.

2. Controlo de inibição das amostras

Quando o teste MTD for negativo mas o diagnóstico do médico for favorável a uma tuberculose, é possível verificar se a amostra contém um inibidor, procedendo da forma seguinte:

- a. Colocar 50 µl de Tampão de Diluição das amostras em 2 tubos de lise das micobactérias (identificado com testemunho e sem testemunho).
- b. Introduzir 50 µl de Testemunho Positivo de Amplificação e 450 µl de amostra num tubo (com testemunho). Adicionar 450 µl de amostra num segundo tubo (sem testemunho). Efectuar o teste seguindo o protocolo habitual.

Interpretação

Se o número RLU (Relative Light Units) obtido no luminómetro com o tubo com testemunho for ≥ 30.000 RLU, a amostra não contém inibidor de amplificação e, aparentemente, não contém alvo a amplificar. Se o número de RLU obtido com o tubo com testemunho for < 30.000 RLU, a amostra contém um inibidor de amplificação e uma outra amostra deve ser analisada. Se o teste repetido do tubo sem testemunho for positivo, o resultado do teste MTD pode considerar-se positivo. A explicação mais plausível para este tipo de resultado, é a variabilidade ligada à amostragem: a primeira amostra não continha alvo a amplificar, enquanto a segunda o continha. O número de RLU do tubo em testemunho pode ser positivo ou negativo dependendo da amostra conter ou não ARNr de micobactéria pertencente ao complexo *M. tuberculosis*.

3. Controlo da contaminação do laboratório

Para controlar se o laboratório foi contaminado pelos amplicons de *M. tuberculosis*, proceder como segue:

- a. Colocar 1 ml de água estéril num tubo limpo. Humidificar uma zaragatoa/swab estéril de poliéster ou dacron com água estéril.
- b. Esfregar a zaragatoa/swab na bancada ou no material a controlar.
- c. Colocar a zaragatoa/swab no tubo e misturar suavemente. Retirar a zaragatoa/swab, espremendo-a na parede do tubo. Eliminar a zaragatoa/swab num recipiente contendo uma solução de lixívia diluída a 1/2 (metade de lixívia, metade de água).
- d. Distribuir 25 μ l da solução obtida num tubo de amplificação contendo 50 μ l de Reagente de Amplificação e 200 μ l de óleo para reacção de amplificação.
- e. Seguir as instruções do parágrafo «PROCEDIMENTO» para a amplificação e a detecção.

Interpretação

Se os resultados forem ≥ 30.000 RLU, a superfície analisada está contaminada e deve ser descontaminada com lixívia seguindo as instruções do parágrafo «PROCEDIMENTO: Preparação do material». Se se suspeitar de uma contaminação do banho-maria, proceder do mesmo modo que o acima descrito com 25 μ l de água do banho-maria, na condição de esta não conter nenhum produto anti-séptico.

Preparação do material

1. A água deverá ser desgaseificada para otimizar a transferência de energia dos ultra-sons.
 - a. Encher o reservatório do sonicador com água da torneira à temperatura ambiente até cerca de 1 cm do bordo.

- b. Para desgaseificar inteiramente a água, colocar o sonicador em funcionamento durante 15 minutos antes do início dos testes.
2. Regular um bloco de aquecimento a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$, um outro bloco de aquecimento ou um banho-maria a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ainda outro bloco de aquecimento ou um banho-maria a $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Limpar as superfícies de trabalho, material e pipetas com uma diluição 1:2 de lixívia antes de começar a análise. Deixar a lixívia actuar durante, pelo menos, 15 minutos. Lavar com água a superfície de trabalho para eliminar os traços de lixívia. Cobrir a superfície na qual o teste será efectuado com uma folha de protecção plastificada para bancada.
4. Preparar o luminómetro Leader. Certificar-se de que há uma quantidade suficiente de Reagentes de Detecção I e II para efectuar os testes e que os tubos são correctamente injectados com os reagentes de detecção. Consultar o Manual de Utilização do luminómetro para as instruções de introdução dos Reagentes de Detecção (estes reagentes são vendidos separadamente).

Preparação do reagente

Reconstituir o Reagente de Amplificação liofilizado (A) no seu frasco (50 testes) com 3 ml de Tampão de Amplificação (AB). Homogeneizar num Vortex. Deixar o reagente reconstituído repousar à temperatura ambiente até ficar claro. O Reagente de Amplificação reconstituído pode conservar-se durante 2 meses a $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$. A solução deve ser colocada à temperatura ambiente antes da utilização.

Preparação das amostras

1. Identificar um número suficiente de Tubos de Lise de Micobactérias (LT) para analisar as amostras, os controlos de amplificação positiva e negativa e os testemunhos de amplificação positivo e negativo.

Retirar e conservar as tampas.

2. Distribuir 50 μl do Tampão de Diluição das Amostras de Micobactérias (SDB) em todos os tubos de lise de Micobactérias (LT):

Proceder como infra descrito em A e B para os controlos e em C para as amostras.

A. Procedimento para Testemunhos de amplificação

Para cada controlo, adicionar 1 ml de solução de NALC/NaOH e 3 ml do tampão fosfato utilizado para efectuar o processamento da expectoração com 1 ml de água estéril no tubo de processamento da amostra.

- I. Homogeneizar em vortex.
- II. Transferir 450 μl de solução de tampão fosfato/NALC/NaOH e 50 μl de diluição de Controlo de Amplificação para o tubo correspondente de lise de micobactérias (LT) identificado.

- B. Se estiverem a ser usados Controlos de Amplificação, transferir 450 µl do recipiente do Controlo de Amplificação para o correspondente tubo de lise de micobactérias (LT) identificado.
 - C. Amostras: Transferir 450 µl de cada amostra descontaminada e homogeneizada do recipiente para o correspondente tubo de lise de micobactérias identificado (LT).
3. Fechar os tubos de lise de Micobactérias (LT) após a adição de cada amostra.
 4. Agitar durante 3 segundos em vortex.

Lise das amostras

1. Inserir os Tubos de Lise no suporte do sonicador de forma a que a mistura de reacção no fundo dos tubos fique imersa, mantendo as tampas fora de água. Colocar o suporte no local. OS TUBOS NÃO DEVEM, EM CASO ALGUM, TOCAR NO FUNDO OU NAS PAREDES DO SONICADOR.
2. Colocar o sonicador em funcionamento durante 15 minutos, mas nunca mais de 20 minutos. As amostras e testemunhos assim tratados com ultra-sons designam-se por «lisados». NÃO UTILIZAR O Vortex PARA AGITAR OS LISADOS.

Amplificação

1. Identificar os tubos de polipropileno para amplificação (12 x 75 mm) escrevendo no topo os números correspondentes aos números de identificação dos Tubos de Lise. Identificar igualmente os tubos de amplificação para os testemunhos de amplificação positivo e negativo.
2. Introduzir 50 µl de Reagente de Amplificação reconstituído no fundo de cada tubo utilizando uma pipeta repetitiva. Adicionar 200 µl de óleo para reacção de amplificação (O) em cada tubo utilizando uma pipeta de repetição.
3. NÃO UTILIZAR O VORTEX PARA OS LISADOS. Transferir 25 µl de cada lisado para o fundo do tubo de amplificação correspondente, utilizando uma nova ponta com filtro para cada transferência. Os lisados que sobrarem podem ser conservados a 2°C - 8°C durante 7 dias, ou congelados a uma temperatura igual ou inferior a -20°C durante 1 mês. Não utilizar congelador com descongelação automática. Se for necessário efectuar outros testes com os lisados, deixá-los atingir previamente a temperatura ambiente. NÃO UTILIZAR O VORTEX PARA OS LISADOS.
4. Incubar os tubos num bloco de aquecimento a 95°C durante 15 minutos, mas não mais de 20 minutos.
5. Preparar a Solução Enzimática adicionando 1,5 ml de Tampão de Diluição Enzimática (EDB) ao Reagente Enzimático liofilizado (E). Rodar para misturar. Não agitar num Vortex. O Reagente Enzimático reconstituído é utilizável durante um mês a 2°C - 8°C ou durante dois meses a uma temperatura igual ou inferior a -20°C, se for distribuído em alíquotas e congelado^B no dia da reconstituição. Se o teste for efectuado com alíquotas de enzimas congeladas, colocá-las previamente à

- temperatura ambiente; não descongelar as alíquotas colocando-as a uma alta temperatura. Para homogeneizar as alíquotas descongeladas, aspirar e rejeitar a solução utilizando uma pipeta de repetição antes de adicioná-la aos tubos de amplificação.
6. Transferir os tubos para um bloco de aquecimento ou banho-maria a $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e deixá-los arrefecer durante 5 minutos. **NÃO DEIXAR OS TUBOS ATINGIREM A TEMPERATURA AMBIENTE. NÃO COBRIR O BANHO-MARIA.**
 7. Quando os tubos estiverem a 42°C , adicionar 25 μl de Reagente Enzimático em cada tubo utilizando uma pipeta de repetição. Sacudir para misturar. Incubar a 42°C durante 30 minutos, mas não mais de 60 minutos. É necessário utilizar folhas autocolantes ou tampas durante esta etapa de incubação. **NÃO COBRIR O BANHO-MARIA.**
 8. Após o período de incubação de 30 minutos, os tubos cobertos podem ser conservados a $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas ou a -20°C até ao dia seguinte. Se forem conservados a -20°C até ao dia seguinte, os tubos devem ser totalmente descongelados à temperatura ambiente ou, no máximo, a 60°C antes da etapa de hibridização, e devem ser, de preferência, fechados com tampas e não com folhas autocolantes.

Hibridização

1. Reconstituir o Reagente de Hibridização liofilizado (H) com 6 ml de Tampão de Hibridização (HB). O Reagente de Hibridização (H) e o Tampão de Hibridização (HB) devem estar à temperatura ambiente antes da reconstituição. Se o Tampão de Hibridização (HB) foi guardado no frigorífico, aquecê-lo a 60°C , rodando-o lentamente para assegurar que todos os componentes se dissolvem. Agitar num Vortex até que a solução fique clara (o que pode demorar cerca de um minuto) para assegurar que todos os componentes estão dissolvidos. O Reagente de Hibridização reconstituído é utilizável durante um mês a $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ ou durante dois meses a uma temperatura igual ou inferior a -20°C , se tiver sido distribuído em alíquotas e congelado^C no dia da reconstituição. Se o Reagente de Hibridização reconstituído foi guardado no frigorífico ou congelado, aquecê-lo a 60°C , rodando-o ligeiramente para assegurar que todos os componentes se dissolvem.
2. Adicionar 100 μl de Reagente de Hibridização reconstituído em cada tubo com uma pipeta de repetição. Cobrir os tubos com folhas autocolantes ou com tampas. Agitar os tubos com um Vortex, a uma velocidade média, 3 vezes durante, pelos menos, 1 segundo^D. Para uma boa homogeneização dos tubos de reacção, mantê-los na posição vertical e deixar a mistura atingir a metade superior da parede do tubo durante a agitação (para evitar qualquer contaminação não deixar a mistura entrar em contacto com as folhas autocolantes ou com as tampas). Quando a homogeneização estiver correctamente efectuada, a mistura deve ter uma cor amarela uniforme.
3. Incubar a 60°C durante 15 minutos, mas não mais de 20 minutos, num bloco de aquecimento ou em banho-maria.

Seleccção

1. O Reagente de Seleccção (S) deve estar à temperatura ambiente antes de começar o teste. Retirar os tubos do banho-maria ou do bloco de aquecimento a 60°C e adicionar 300 µl de Reagente de Seleccção (S) com uma pipeta de repetição. Cobrir os tubos com folhas autocolantes ou com tampas. Agitar num Vortex, a uma velocidade média, 3 vezes durante, pelo menos, 1 segundo^D. Para uma boa homogeneização dos tubos de reacção, mantê-los na posição vertical e deixar a mistura atingir a metade superior da parede do tubo durante a agitação (para evitar qualquer contaminação não deixar a mistura entrar em contacto com as folhas autocolantes ou com as tampas). Quando a homogeneização estiver correctamente efectuada, a mistura deve ter uma cor rosa uniforme.
2. Incubar a 60°C durante 15 minutos, mas não mais de 16 minutos, num bloco de aquecimento ou num banho-maria.
3. Retirar os tubos do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Deixar os tubos atingirem a temperatura ambiente durante, pelo menos, 5 minutos, mas não mais de uma hora. Retirar as folhas autocolantes ou as tampas imediatamente antes da fase de detecção.

Detecção

1. Programar o procedimento apropriado no luminómetro. Escolher uma leitura de 2 segundos.
2. Para eliminar qualquer resíduo da superfície dos tubos, limpá-los com um papel absorvente húmido que não se desfaça com a humidade, e depois introduzi-los no luminómetro seguindo as instruções do manual de utilização. Os tubos devem ser lidos na hora a seguir à etapa de selecção.
3. Quando a análise tiver terminado, retirar os tubos do luminómetro.
4. Após a leitura dos tubos, enchê-los cuidadosamente com uma solução de lixívia diluída a 1/10 (um volume de lixívia, 9 volumes de água, utilizando um esguicho. Deixar a lixívia actuar durante, pelo menos, uma hora antes de eliminar os tubos, para evitar a contaminação do laboratório com amplicons.
5. Os suportes de tubos devem ser descontaminados por imersão completa numa solução de lixívia diluída a 1/2 durante, pelo menos, 15 minutos. Em seguida, devem-se lavar com água e enxugar, ou secar ao ar.
6. Descontaminar o laboratório e o material utilizando uma solução de lixívia diluída a 1/2.

Repetição do teste

1. Se tiver de repetir o teste, deixar os lisados atingir a temperatura ambiente.
NÃO UTILIZAR O VORTEX PARA OS LISADOS.
2. Seguir o protocolo de «PROCEDIMENTO» começando pela etapa de amplificação.

NOTAS

A. Reagentes

1. O Reagente Enzimático não deve permanecer à temperatura ambiente mais de 15 minutos após a reconstituição.
2. O Tampão de Hibridização (HB) pode precipitar. Aquecer e agitar o Tampão de Hibridização (HB) ou o Reagente de Hibridização reconstituído a 60°C para dissolver o precipitado.

B. Temperatura

1. A amplificação, a hibridização e a selecção são reacções termo-dependentes; consequentemente, é imperativo manter o banho-maria ou o bloco de aquecimento às temperaturas preconizadas.
2. Antes de adicionar o Reagente Enzimático, deixar arrefecer os tubos a 42°C durante 5 minutos. Esta temperatura permite obter um comportamento funcional óptimo de amplificação.
3. É fundamental respeitar a temperatura para a fase de amplificação ($42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

C. Tempo

É imperativo respeitar os tempos indicados no parágrafo «PROCEDIMENTO».

D. Banho-maria

1. O nível de água no banho-maria deve manter-se de forma a que a mistura de reagentes no fundo dos tubos esteja imersa, mas que a água não penetre nos tubos.
2. Durante a fase de amplificação, o banho-maria não deve ser coberto para evitar que haja condensação sobre ou dentro dos tubos.

E. Agitação utilizando um Vortex

É importante dispor de uma mistura homogénea durante as etapas de hibridização e de selecção, especialmente após a adição do Reagente de Hibridização (H) reconstituído (a mistura fica com uma cor amarela uniforme) e do Reagente de Selecção (S) (a mistura fica com uma cor rosa uniforme).

A agitação com Vortex permite obter uma suspensão uniforme. Quando os reagentes são colocados no tubo de reacção e expostos a uma fonte de energia exterior, produz-se uma rotação rápida da solução à volta do eixo do tubo. Daí resulta uma suspensão uniforme. Para que a homogeneização seja correctamente efectuada num Vortex, os tubos devem segurar-se na parte superior e manter-se na vertical. O líquido deve então atingir a metade superior do tubo durante a agitação. Durante as etapas de hibridização e de selecção, esta agitação deve efectuar-se 3 vezes seguidas e durar, pelo menos, 1 segundo de cada vez.

INTERPRETAÇÃO DO TESTE

Os resultados do teste AMPLIFIED PARA A DETECÇÃO DIRECTA DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (MTD) são interpretados considerando que um resultado negativo inicial (< 30.000 RLU), um resultado positivo inicial (≥ 500.000 RLU), ou um resultado equívoco inicial (30,000 a 499,999 RLU). O teste MTD deve ser repetido a partir do lisado reservado quando um teste inicial é equívoco. Um resultado repetido do lisado > 30.000 é considerado positivo.

A. Controlo de qualidade e validação de resultados

Os controlos devem dar os seguintes valores:

- Controlo negativo de amplificação < 20.000 RLU
- Controlo positivo de amplificação ≥ 500.000 RLU
- Testemunho negativo < 20.000 RLU
- Testemunho positivo ≥ 1.000.000 RLU

Os resultados dos testes dos pacientes não devem ser fornecidos se os valores do controlo de teste MTD não estiverem dentro destes critérios. Consultar a tabela de RESOLUÇÃO DE INCIDENTES para informações complementares.

Cada laboratório deve determinar os valores alvo para cada controlo em função dos resultados obtidos para cada série de controlos.

B. Resultados de Testes de Pacientes

Se os valores dos controlos não estiverem dentro dos valores esperados, os resultados das amostras de testes de pacientes não devem ser validados.

Resultados:

- ≥ 500.000 RLU positivo para o ARNr do complexo *M. tuberculosis*
- < 30.000 RLU negativo para o ARNr do complexo *M. tuberculosis*
- 30.000 a 499.999 RLU provável rRNA positivo do complexo de *M. tuberculosis*;
repetir para verificar os resultados:
 - Repetir ≥ 30.000 RLU positivo para o complexo rRNA para *M. tuberculosis*
 - Repetir < 30.000 RLU negativo para o complexo rRNA para *M. tuberculosis*

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do teste MTD devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos e laboratoriais. Deve ser considerada a possibilidade de ser testada uma outra amostra consoante a suspeita clínica existente.

Se o resultado de teste MTD inicial for positivo ≥ 500.000 RLU, ou se o resultado do teste MTD repetido for positivo ≥ 30.000 RLU, apresentar os resultados da forma seguinte:

Apresentar:	Foi detectado o rRNA do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Coloração AFB (positiva ou negativa)
Informação adicional:	Cultura de AFB em crescimento. As amostras podem conter MOTT e <i>M. tuberculosis</i> ou apenas <i>M. tuberculosis</i> . Este teste não deve ser efectuado isoladamente para o diagnóstico <i>M. tuberculosis</i> . O valor positivo preditivo para uma amostra com coloração AFB negativa é mais baixo que para uma amostra com coloração AFB positiva. Tal é particularmente importante ao testar amostras de populações em que a prevalência de <i>M. tuberculosis</i> é baixa e os valores esperados com métodos de diagnóstico correspondentes são reduzidos.

Se o resultado de teste MTD ou a repetição deste for negativa < 30.000 RLU, apresentar os resultados da forma seguinte:

Apresentar:	Não foi detectado o rRNA do complexo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Coloração AFB (positiva ou negativa).
Informação adicional:	Não foi detectado o rRNA do complexo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Cultura de AFB em crescimento. As amostras podem não conter <i>M. tuberculosis</i> , o resultado pode ser falso negativo devido a baixos números de <i>M. tuberculosis</i> na presença ou ausência de MOTT, ou o resultado pode ser falso negativo devido a interferência de inibidores da amostra. É recomendado testar uma nova amostra do paciente se, clinicamente, houver forte suspeita de tuberculose ou se houver suspeita de inibição.

LIMITES

Este teste destina-se apenas à detecção das micobactérias do complexo *M. tuberculosis* a partir de amostras preparadas segundo os procedimentos NALC-NaOH ou NaOH recomendados pelo CDC⁷. Este teste só pode ser efectuado com amostras preparadas a partir de expectorações (induzidas ou expectoradas), de colheitas/coletas brônquicas (lavagens bronco-alveolares ou aspirações brônquicas) ou de aspirações traqueais.

O teste MTD é específico das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, ou seja, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti*, mas não as diferencia entre si. *M. celatum* e *M. tipoterrae* podem provocar reacções cruzadas se estiverem presentes em concentrações superiores a 30 UFC por teste. No entanto, *M. celatum* e *M. tipo-terrae* são raramente isoladas em clínica.

A qualidade dos resultados do teste está ligada à qualidade da colheita/coleta e ao seu transporte, à variabilidade das colheitas/coletas, aos erros técnicos do laboratório, aos erros de identificação das amostras e aos erros de transcrição dos resultados. Um teste negativo não exclui a presença de uma micobactéria do complexo *M. tuberculosis* na amostra.

VALORES ESPERADOS

A. Intervalo dos valores de controlo obtidos no decurso de ensaios clínicos

O intervalo dos valores obtidos para os controlos (RLU) no decurso dos ensaios clínicos efectuados em 7 locais, foi:

	RLU (N=704)	
	Intervalo	Média
Testemunho Positivo de Amplificação	556.245 to >2.000.000	>2.000.000
Testemunho Negativo de Amplificação	904 to 18.754	3.041

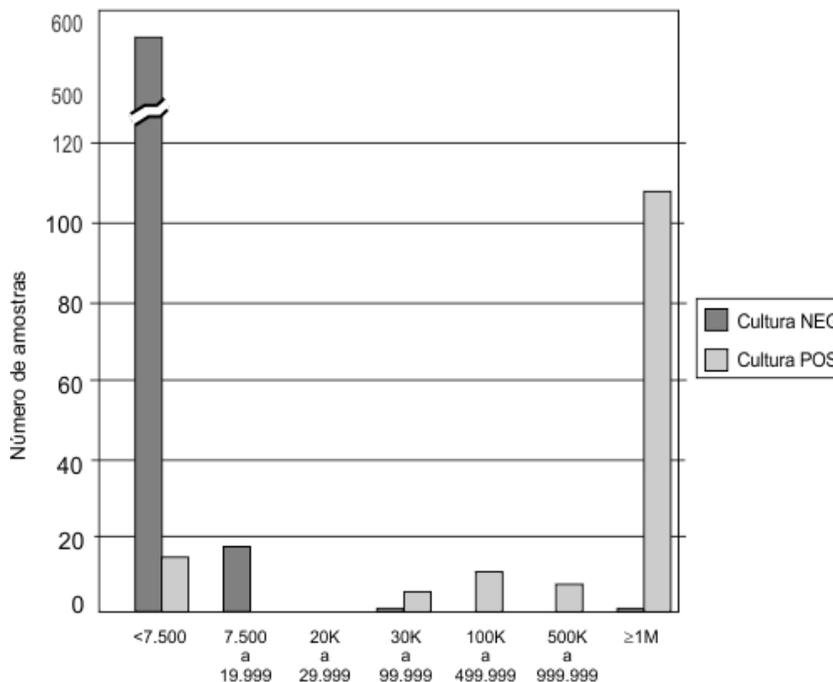
B. Intervalo dos valores obtidos para amostras clínicas

Para 127 amostras MTD-positivas, os valores estavam compreendidos entre 35.777 e > 2.000.000 RLU.

Para 577 amostras MTD-negativas, os valores estavam compreendidos entre 573 e 19.176 RLU.

A distribuição dos resultados em RLU para todas estas amostras, após resolução das discordâncias, encontra-se aqui abaixo: a resolução das discordâncias baseia-se na análise de outras amostras, positivas em cultura, provenientes do mesmo paciente e/ou com diagnóstico final do médico.

Quadros dos resultados obtidos a partir de amostras
Provenientes de pacientes nao tratados (7 locais)
N=704



Résultados da cultura

<i>M. tuberculosis</i> NEG	554	19	0	1	0	0	1
<i>M. tuberculosis</i> POS	13	0	0	4	7	6	108

COMPORTAMENTO FUNCIONAL

A. Avaliação clínica

O comportamento funcional do teste MTD na sua forma original foram avaliadas no decurso de ensaios clínicos efectuados em seis laboratórios, comparando os resultados obtidos por exame de esfregaços com os resultados da cultura, em 6.079 amostras provenientes de 2.609 pacientes. Entre estas, 4.000 amostras provinham de 1.898 pacientes que não receberam tratamento anti-tuberculose. Os seis locais representavam zonas geográficas diferentes: cinco hospitais de grandes cidades americanas, com um serviço especializado para a tuberculose, e um laboratório público.

O comportamento funcional do teste MTD na sua forma actual foram avaliadas em sete locais, comparando os resultados do teste MTD com os resultados da cultura. Os sete hospitais que participaram no teste representavam zonas geográficas diferentes: seis hospitais de grandes cidades americanas, com um serviço especializado para a tuberculose, e um laboratório público nacional de micobacteriologia. As amostras analisadas eram provenientes de pacientes que não receberam tratamento anti-tuberculose. 132 deram resultados positivos na cultura para as micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. MTD detectou 119 destas amostras cultura-positivas; 7 amostras continham micobactérias não tuberculosas para além das *M. tuberculosis*.

**AMOSTRAS
PROVENIENTES DE PACIENTES NÃO TRATADOS**
Comparação MTD / cultura (N=704)

POR PACIENTE (antes da resolução das discordâncias)			POR PACIENTE (após resolução das discordâncias)		
Cultura	+	-	Cultura	+	-
MTD +	54	4	MTD +	56	2
MTD -	4	221	MTD -	4	221

POR AMOSTRA (antes da resolução das discordâncias)			POR PACIENTE (após resolução das discordâncias)		
Cultura	+	-	Cultura	+	-
MTD +	119	8	MTD +	125	2
MTD -	13	564	MTD -	13	564

Foram incluídos neste estudo pacientes suspeitos de terem uma tuberculose pulmonar activa, e não estando sob tratamento. A prevalência total dos pacientes que tiveram uma cultura positiva para *M. tuberculosis* foi de 20,5%.

Foram determinadas, por paciente, uma sensibilidade média de 93,3% e uma especificidade média de 99,1% em relação à cultura. Foram determinadas, por amostra, uma sensibilidade média de 90,6% e uma especificidade média de 99,6% em relação à cultura. O quadro abaixo dá a sensibilidade, especificidade, valor predictivo positivo (VPP) e o valor predictivo negativo (VPN), com intervalos de confiança de 95%, para as estimativas do comportamento funcional. Todos os dados são apresentados após resolução das discordâncias, baseada na existência de outras amostras, com cultura positiva, provenientes do mesmo paciente e/ou com diagnóstico final do médico.

Por paciente:

	Percentagem média	Número / Total	Intervalo de confiança de 95%
Sensibilidade	93.3%	56/60	83.8 – 98.2%
Especificidade	99.1%	221/223	96.8 – 99.9%
VPP	96.6%	56/58	88.1 – 99.6%
VPN	98.2%	221/225	95.5 – 99.5%

Por amostra:

	Percentagem média	Número / Total	Intervalo de confiança de 95%
Sensibilidade	90.6%	125/138	84.4 – 94.9%
Especificidade	99.6%	564/566	98.7 – 100%
VPP	98.4%	125/127	94.4 – 99.8%
VPN	97.7%	564/577	96.2 – 98.8%

Das 564 amostras com cultura e MTD negativas para o complexo *M. tuberculosis*, 114 amostras continham micobactérias atípicas, detectadas em cultura, 64 provinham de pacientes em que outras amostras permitiram isolar micobactérias atípicas em cultura e 169 provinham de pacientes em que não foi isolada nenhuma micobactéria em cultura.

B. Precisão

Foram analisados, em três locais, dois painéis de amostras, consistindo em 2 amostras negativas, 2 amostras fracamente positivas (^a 100 UFC/ teste) e 2 amostras moderadamente positivas (^a 1000 UFC/ teste). As amostras positivas foram preparadas adicionando quantidades conhecidas de *M. tuberculosis* a um pool de amostras moderadamente inibidor. Tanto as amostras como os testemunhos de amplificação positivo e negativo foram testados em triplicado, duas vezes por dia, durante 3 dias em três locais.

Não houve variabilidade significativa de resultados de um local para outro ou de um dia para outro e assim, os resultados dos três locais puderam ser consolidados e apresentam-se aqui abaixo. Os valores de leitura medidos em RLU estão limitados pela resolução do tubo fotomultiplicador do luminómetro. Por esta razão, os valores superiores a 2.000.000 RLU foram truncados. Nem os desvios-padrão, nem os coeficientes de variação são indicados.

	Precisão			
	Número de observações	% de resultados correctos	Intervalo (RLU)	Média (RLU)
Amostras 1: Positivas fortes	108	100%	154.103 - >2.000.000	>2.000.000
Amostras 2: Positivas fracas	108	99,1%	16.324 - >2.000.000*	>2.000.000
Amostras 3: Negativas	108	100%	2.004 - 5.693	2.689
Testemunho positivo	54	100%	>2.000.000	>2.000.000
Testemunho negativo	54	100%	2.272 - 4.241	2.944

*Observou-se um resultado negativo.

C. Reprodutibilidade

O estudo da reprodutibilidade foi efectuado com 25 amostras, intercaladas com testemunhos de amplificação negativos para um total de 50 amostras. O painel de reprodutibilidade foi testado em quatro locais.

No total, 100% (120/120) das amostras negativas e 98,8 % (79/80) das amostras positivas deram os resultados esperados.

D. Especificidade analítica

A especificidade do teste MTD foi avaliada com bactérias, fungos e vírus. No caso das bactérias e dos fungos, os testes de especificidade incluírem 160 estirpes/cepas (151 espécies provenientes de 62 géneros) de micobactérias muito próximas de *M. tuberculosis*, outros microrganismos responsáveis por doenças respiratórias, e um painel filogenético de microrganismos da flora comensal do aparelho respiratório. As estirpes/cepas-tipo eram culturas ATCC (American Type Culture Collection), e 5 estirpes/cepas foram fornecidas por laboratórios de análises. Os lisados, preparados a partir de culturas em crescimento activo (ou de ARNr, em três casos) foram analisados seguindo o procedimento do teste MTD com cerca de 5×10^7 UFC por teste. Só as estirpes/cepas do complexo *M. tuberculosis* deram resultados positivos, exceptuando as estirpes/cepas *M. celatum* e *M. tipo-terrae*.

Com concentrações superiores a 30 UFC por teste, as estirpes/cepas de *M. celatum* e algumas estirpes/cepas de *M. tipo-terrae* deram resultados positivos (26.772 RLU para *M. celatum* e de 19.470 a 49.976 RLU para *M. tipo-terrae*).

E. Limite de detecção

Foram detectadas, com o teste MTD, trinta estirpes/cepas de *M. tuberculosis* provenientes de regiões geográficas muito variadas, incluindo representantes de estirpes/cepas resistentes e de estirpes/cepas sensíveis aos antibióticos. O teste MTD detectou até 1 UFC por teste, de cada uma destas estirpes/cepas.

F. Teste de sobrecarga

Foram analisados os ARNr de *Mycobacterium tuberculosis*, com uma concentração de 25 fg (equivalente a 5 UFC por teste), na presença de cerca de 540.000 UFC por teste (450 µl) dos organismos não alvo seguintes: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. terrae*, *Nocardia asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae*, *Gordona sputi* e *Rhodococcus bronchialis*. Todos os resultados foram positivos para o ARNr de *M. tuberculosis* na presença destes organismos nãoalvo, os quais, portanto, não criaram interferência.

RESOLUÇÃO DE INCIDENTES

OBSERVAÇÃO	CAUSAS POSSÍVEIS	RECOMENDAÇÕES
Controlo negativo de amplificação elevado ou Controlo negativo de Processamento da amostra (≥ 20.000 RLU)	Homogeneização insuficiente após adição do Reagente de Selecção (S) ou volume insuficiente de Reagente de Selecção.	Voltar a homogeneizar correctamente. Respeitar os volumes indicados. Verificar o aparecimento de uma solução de cor rosa uniforme após a agitação.
	Amplificação de contaminantes introduzidos por falta de precaução no decurso da preparação das reacções.	Deve ter-se muito cuidado com a utilização das pipetas na distribuição dos reagentes. Os tubos usados devem ser descontaminados com uma solução de lixívia a 1/10, como indica-do no parágrafo «PROCEDIMENTO». As bancadas, blocos de aquecimento, banhos-maria e pipetas devem ser descontaminados com uma solução de lixívia diluída a 1/2 como indicado no parágrafo «PROCEDIMENTO».
	Omissão da etapa de arrefecimento de 5 minutos.	
	Contaminação do laboratório ou dos reagentes.	
Controlo Positivo de Amplificação Baixo ou Controlo Positivo de Processamento da Amostra (< 500.000 RLU)	Omissão da limpeza dos tubos antes da leitura no luminómetro.	Os tubos devem limpar-se com papel absorvente húmido que não se desfaça, antes da leitura no luminómetro.
	Desrespeito das temperaturas preconizadas na etapa de amplificação.	Verificar a temperatura do banho-maria e/ou do bloco de aquecimento e ajustá-la, se necessário, para respeitar as temperaturas preconizadas.
	Adição do Reagente de Amplificação deitando o líquido sobre as paredes do tubo e não directamente no fundo.	
	Homogeneização insuficiente após adição do Reagente de Hibridização reconstituído.	Agitar cuidadosamente num Vortex, como especificado (consultar o parágrafo «Hibridização/ 2»). Verificar a formação de uma solução de cor amarela uniforme após a agitação.
	Volume excessivo de Reagente de Selecção.	Verificar a regulação do volume na pipeta.

OBSERVAÇÃO	CAUSAS POSSÍVEIS	RECOMENDAÇÕES
	Desrespeito do tempo preconizado para a etapa de selecção.	Respeitar os 15 minutos de incubação a 60° C, no decurso da etapa de Selecção.
	A temperatura dos tubos desceu a menos de 42°C após a incubação a 95° C.	Transferir directamente os tubos do bloco de aquecimento a 95° C para banho-maria / bloco de aquecimento a 42° C.
	Os tubos de passagem do Reagente de Detecção estão entupidos.	Lavar os tubos com água quente como indicado no manual de utilização do aparelho.

NOTAS

- A. Os blocos de aquecimento devem conter poços previstos para tubos de 12 x 75 mm. Aconselha-se a utilização dos blocos de aquecimento .
- B. Para a conservação das alíquotas congeladas recomenda-se a utilização de tubos de microcentrífuga com tampa. As alíquotas congeladas individualmente podem ser descongeladas apenas uma vez. Não devem ser usados congeladores com descongelação automática.
- C. Recomenda-se a utilização de frascos de congelação de 5 ml para a conservação das alíquotas congeladas. As alíquotas congeladas individualmente podem ser descongeladas apenas uma vez. Não devem ser usa-dos congeladores com descongelação automática.
- D. As performances dos Vortex podem variar consoante o material utilizado podendo, por isso, ser necessário adaptar o tempo de agitação. Regular a velocidade do aparelho e seguir as instruções do «PROCEDIMENTO, parágrafo E», para deixar a mistura de reacção atingir a metade superior da parede do tubo. É indispensável uma boa homogeneização para obter resultados precisos. O tempo de agitação pode ir até 15 segundos, sem afectar os resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association, 1983. *Levels of laboratory services for mycobacterial diseases*. Am. Rev. Respir. Dis. **128**:213.
2. **Arnold, L.J., P.W. Hammond, W.A. Wiese, and N.C. Nelson**, 1989. Assay formats involving acridinim-ester-labeled DNA probes. Clin. Chem. **35**:1588-1594.
3. **Bradley, S.T., S.L. Reed and A. Catanzaro**, 1996. Clinical Efficacy of the Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **153**:1606-1610.
4. Centers for Disease Control, 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
5. Centers for Disease Control and Prevention, and National Institute of Health. May, 1993. 3rd Edition. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. pp. 93-96.
6. **Collins, F. M.**, 1989. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. Clin. Microbiol. Rev. **2**: 360-377.
7. **Kent, P.T. and G.P. Kubica**, 1985. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control: Principles and definitions; Approved Guideline. NCCLS document C24-A. Villanova, PA: NCCLS; 1991.
9. **Pitchenik, A.E., D. Fertel, and A.B. Block**, 1988. *Mycobacterial Disease: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention*. Clin. Chest Med. **9**:425-441.
10. **Roberts, G.D., E.W. Koneman, and Y.K. Kim**, 1991. Mycobacterium, pp. 304-339. In A. Balows, et al. (eds.), Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. **Simone, P.M. and Iseman, M.D.**, 1992. Drug-resistant Tuberculosis: A Deadly and Growing Danger. J. Resp. Dis. **13**:960-971.
12. **Wayne, L.G.**, 1982. Microbiology of the tubercle bacilli. Am. Rev. Respir. Dis. **125** (3 pt 2):31-41.
13. **Van Soolingen, D.**, et al. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Intl. J. Syst. Bacteriol. **47**:1236-1245.
14. **Kerleguer A., Koeck J. L., Fabre M., G r me P., Teyssou R., Herv  V.**, 2002. Application of a Grey-Zone for the Interpretation of The "Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for the Rapid Diagnosis of Respiratory Tuberculosis." Esm May 2002.
15. **Coll P, Garrig  M., Moreno C., Marti N.**, 2002. "Routine Use of E-MTD (Hologic) For Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Samples." Esm 2002.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA

Apoio ao Cliente: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com

Suporte técnico: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Para obter mais informações sobre contactos, acesse a www.hologic.com.

Hologic e Amplified MTD são marcas comerciais e/ou marcas registadas da Hologic, Inc. e/ou respectivas subsidiárias nos EUA e/ou em outros países.

Quaisquer outras marcas comerciais que possam aparecer neste folheto informativo pertencem aos respectivos proprietários.



Authorized Representative
EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands

AW-12601-601 Rev. 001 (PT)
©1995 - 2015 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.
2015-03