

Xpert® MTB/RIF

REF GXMTB/RIF-US-10

For Information Only - Not a Controlled Copy

Trademark, Patents and Copyright Statements

Cepheid[®], the Cepheid logo, GeneXpert[®] and Xpert[®] and Xpertise[™] are trademarks of Cepheid.

Windows[®] is a trademark of Microsoft Corporation.

Neo-Synephrine[®] is a trademark of Bayer HealthCare LLC.

BACTEC[™] and MGIT[™] are trademarks of Becton Dickinson.

INTROL[™] is a trademark of Maine Molecular Quality Controls, Inc.

This product is sold under license from the Public Health Research Institute and may be used under PHRI patent rights only for human *in vitro* diagnostics.

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

Copyright © 2020 Cepheid. All rights reserved.



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Xpert® MTB/RIF Assay

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Rx Only

1. Nome proprietário

Xpert® MTB/RIF

2. Nome comum ou usual

Xpert MTB/RIF Assay

3. Utilização prevista

O Xpert® MTB/RIF Assay, realizado nos sistemas de instrumentos GeneXpert®, consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, qualitativo, de reacção em cadeia da polimerase (PCR) “nested” em tempo real destinado à detecção do ADN do complexo *Mycobacterium tuberculosis* na expectoração em estado natural ou em sedimentos concentrados a partir de expectoração induzida ou espontânea. Em amostras onde o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (complexo MTB) é detectado, o Xpert MTB/RIF Assay detecta também as mutações do gene *rpoB* associadas à resistência à rifampicina.

O Xpert MTB/RIF Assay destina-se a ser utilizado com amostras de pacientes com suspeita clínica de tuberculose (TB) e que não tenham recebido terapêutica anti-tuberculose ou com menos de três dias de terapêutica. O teste destina-se a servir como auxiliar do diagnóstico da tuberculose pulmonar quando utilizado em conjunto com resultados clínicos e outros resultados laboratoriais.

Um resultado no Xpert MTB/RIF Assay de “MTB NOT DETECTED” (MTB NÃO DETECTADO) de uma ou duas amostras de expectoração é altamente preditivo da ausência de bacilo de complexo *M. tuberculosis* em esfregaços de expectoração tratados com ácido fluorescente de série de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar activa e pode ser utilizado como uma ajuda na tomada de decisão relativa à manutenção do isolamento respiratório em pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar. Para se determinar se o teste a uma ou duas amostras de expectoração é apropriado para a tomada de decisões relacionadas com o afastamento do isolamento respiratório devem ponderar-se circunstâncias clínicas específicas e directrizes institucionais. As decisões clínicas relacionadas com a necessidade de isolamento respiratório contínuo devem realizar-se sempre em conjunto com outras avaliações clínicas e laboratoriais e os resultados do Xpert MTB/RIF Assay não devem constituir a única base para práticas de controlo de infecções.

O Xpert MTB/RIF Assay deve ser sempre utilizado em conjunto com a cultura de micobactérias para detectar o risco de resultados falso negativos e para recuperar os organismos quando o complexo MTB está presente para posterior caracterização e teste de susceptibilidade a fármacos. Contudo, as decisões relacionadas com o afastamento de pacientes de isolamento respiratório não precisam de aguardar os resultados da cultura. As amostras de expectoração para cultura de TB, esfregaço de BAR microscópico e teste no Xpert MTB/RIF Assay devem cumprir as recomendações dos CDC no que diz respeito aos métodos de colheita e aos prazos entre a colheita de amostras.

O Xpert MTB/RIF Assay não confirma a susceptibilidade à rifampicina, pois podem existir mecanismos de resistência à rifampicina para além dos detectados por este dispositivo, os quais podem estar associados à falta de resposta clínica ao tratamento.

No caso de amostras que contenham ADN do complexo MTB e mutações do gene *rpoB* associadas à resistência à rifampicina detectadas pelo Xpert MTB/RIF Assay, os resultados deverão ser confirmados num laboratório de referência. Se for confirmada a presença de mutações do gene *rpoB* associadas à resistência à rifampicina, as amostras devem também ser testadas relativamente à presença de mutações genéticas associadas à resistência a outros fármacos.

O Xpert MTB/RIF Assay deve ser realizado apenas em laboratórios que sigam as práticas de segurança de acordo com a publicação CDC/NIH Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e as leis e regulamentos estatais ou locais aplicáveis.

4. Resumo e explicação

Existem, a nível mundial, 2 mil milhões de pessoas infectadas com MTB.¹ Em 2010, 8,8 milhões de pessoas desenvolveram a doença activa e 1,4 milhões perderam a vida devido a esta doença.² Em 2012, registaram-se 9951 novos casos de tuberculose nos Estados Unidos da América (uma taxa de ocorrência de 3,2 casos por cada 100 000 pessoas). Em 2011, verificaram-se nos EUA 536 mortes atribuídas a infecções por tuberculose.^{3,4}

Os regimes de tratamento padrão para a tuberculose envolvem a administração prolongada de vários fármacos e são, normalmente, altamente eficazes. Contudo, as estirpes do complexo MTB resistentes a um ou mais dos fármacos de primeira linha exigem um tratamento individualizado. A resistência à rifampicina é frequentemente um indicador de tuberculose multiresistente (TBMR), que pode ser definida como tuberculose resistente à rifampicina (RIF) e à isoniazida (INH), no mínimo. Nos Estados Unidos da América, a resistência à RIF é, em geral, de aproximadamente 1,8%, sendo cerca de 90% destas estirpes resistentes, pelo menos, à RIF e à INH.⁵

A TB pulmonar activa é uma doença altamente infecciosa transmitida por via aérea. Todos os pacientes em estabelecimentos de saúde para os quais haja suspeita de TB devem ser mantidos em isolamento respiratório, de acordo com as directrizes de controlo de infecções recomendadas.⁶ O teste de uma ou duas amostras de expectoração com o Xpert MTB/RIF Assay pode servir como alternativa aos esfregaços de expectoração tratados com ácido de série para ajudar na decisão de manutenção de precauções de controlo de infecção contínuas em pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar.

As amostras de expectoração que são de esfregaço de BAR negativas, mas subsequentemente têm uma cultura TB positiva, apresentam cargas de organismos de complexo MTB mais baixas do que as amostras de esfregaço de BAR positivas. Devido à maior sensibilidade do Xpert MTB/RIF Assay para a detecção de complexo MTB do que o tratamento de microscopia com ácido, o complexo MTB pode ser detectado pelo Xpert MTB/RIF Assay em amostras de esfregaço de BAR negativas.

Sabe-se que os pacientes com infecção por VIH e TB pulmonar apresentam menores cargas no organismo de complexo MTB nas respectivas amostras de expectoração em comparação com os pacientes não infectados com VIH, não obstante uma evolução da doença mais rápida se não for tratada. Consequentemente, as amostras de expectoração de doentes infectados com VIH e com TB pulmonar costumam ter amostras de esfregaço de BAR negativas com mais frequência do que as dos doentes não infectados com VIH. As taxas de detecção globais de complexo de MTB com o Xpert MTB/RIF Assay podem ser inferiores em ambientes com uma elevada percentagem de pacientes infectados com VIH porque estes pacientes têm mais probabilidades de produzirem amostras de esfregaço de BAR negativas com reduzidas cargas de organismos.

5. Princípio do procedimento

O Xpert MTB/RIF Assay consiste num teste de diagnóstico *in vitro* automático que utiliza PCR “nested” em tempo real para a detecção qualitativa do complexo MTB e da resistência à RIF. Os iniciadores neste teste amplificam uma parte do gene *rpoB* que contém a região “core” com 81 pares de bases. As sondas foram concebidas para estabelecer a diferença entre a sequência conservada do tipo selvagem e as mutações na região “core” que estão associadas à resistência à RIF. Este ensaio pode ser executado nos sistemas de instrumentos GeneXpert® da Cepheid.

Os sistemas de instrumentos GeneXpert automatizam e integram a purificação de amostras, a amplificação de ácidos nucleicos e a detecção da sequência-alvo utilizando transcriptase reversa-PCR em tempo real (RT-PCR) e ensaios de PCR em tempo real. Os sistemas são constituídos por um instrumento, um computador e software pré-instalado para execução de testes e visualização dos resultados. Os sistemas requerem a utilização de cartuchos GeneXpert descartáveis, de utilização única que contêm os reagentes para RT-PCR e PCR e onde decorrem os processos de RT-PCR e PCR. Dado que os cartuchos são independentes, é minimizada a contaminação cruzada entre amostras. Para obter uma descrição completa dos sistemas, consulte o *Manual do Utilizador do Sistema GeneXpert Dx* ou o *Manual do Utilizador do Sistema GeneXpert Infinity*.

O Xpert MTB/RIF Assay inclui reagentes para a detecção do complexo MTB e de resistência à RIF a partir de amostras de expectoração em estado natural e em sedimentos concentrados de expectoração. Também estão incluídos no cartucho um Controlo de processamento da amostra (SPC) e um Controlo de verificação da sonda (PCC). O SPC está presente para controlar o processamento adequado das bactérias-alvo e para monitorizar a presença de inibidores na reacção PCR. O controlo de verificação da sonda (PCC) verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo de PCR no cartucho, a integridade da sonda e a estabilidade do corante.

O Xpert MTB/RIF Assay detecta simultaneamente o complexo MTB e a resistência à RIF, amplificando uma sequência específica do complexo MTB do gene *rpoB*, o qual é sondado com cinco marcadores moleculares (sondas A – E) quanto a mutações na região determinante de resistência à rifampicina (RRDR). Cada marcador molecular é marcado com um fluoróforo diferente. O limiar de ciclo (Ct) máximo válido de 39,0 para as sondas A, B e C e de 36,0 para as sondas D e E é definido para a análise de dados do MTB/RIF.

- **MTB DETECTED (MTB DETECTADO)** é apresentado quando pelo menos duas sondas resultam em valores Ct dentro do intervalo válido e numa variação de Ct delta mín. (a menor diferença de Ct entre qualquer par de sondas) inferior a 2,0.
- **Rif Resistance NOT DETECTED (Resistência à Rif NÃO DETECTADA)** é apresentado quando a variação de Ct delta máx. (a diferença de Ct entre a sonda inicial e final) é $\leq 4,0$.
- **Rif Resistance DETECTED (Resistência à Rif DETECTADA)** é apresentado quando a variação de Ct delta máx. é $> 4,0$.
- **Rif Resistance INDETERMINATE (Resistência à Rif INDETERMINADA)** é apresentado quando se verificam as duas condições seguintes:
 1. o valor de Ct de qualquer sonda ultrapassa o Ct máximo válido (ou é zero, i.e., não ultrapassa o limiar); e
 2. o valor *rpoB* Ct inicial é superior a:

$$[(\text{Ct máximo válido de sonda na condição 1}) - (\text{cut-off delta Ct máx. de 4,0})].$$
- **MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADA)** é apresentado quando existe apenas uma ou nenhuma sonda positiva.

Todas as definições do ensaio são incluídas como cálculos automáticos no protocolo do Xpert MTB/RIF e não podem ser modificadas pelo utilizador.

6. Reagentes e instrumentos

6.1 Materiais fornecidos



O kit do Xpert MTB/RIF Assay contém reagentes em quantidade suficiente para o processamento de 10 amostras ou amostras para controlo de qualidade. O kit contém o seguinte:

Cartuchos do ensaio Xpert MTB/RIF Assay com tubos de reacção integrados	10
• Esfera 1 (liofilizada)	2 de cada por cartucho
• polimerase	
• dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatos)	
• sonda	
• BSA (seroalbumina bovina)	
• Esfera 2 (liofilizada)	2 de cada por cartucho
• iniciadores	
• sondas	
• BSA (seroalbumina bovina)	
• Esfera 3 (liofilizada)	1 por cartucho
• controlo de processamento da amostra (SPC) ~6000 esporos <i>B. globigii</i> não infecciosos	
• Reagente 1	4 ml por cartucho
• tampão Tris	
• tensoactivos	
• EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético)	
• Reagente 2	4 ml por cartucho
• tampão Tris	
• tensoactivos	
• EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético)	
Reagente de amostra	8 ml por frasco
• hidróxido de sódio	
• isopropanol	
Pipetas de transferência descartáveis	12
CD	1 por kit
• Ficheiro de definição do ensaio (ADF) — ADF para ser utilizado com os sistemas GeneXpert Dx e Infinity	
• Instruções para importar o ADF para o software GX	
• Folheto informativo	

- Nota** O reagente de amostra (RA) pode ser incolor a amarelo a âmbar. A cor pode intensificar-se com o tempo, mas a cor não tem qualquer efeito sobre o desempenho.
- Nota** As Fichas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) estão disponíveis em www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com, no separador **SUPPORT (APOIO)**.
- Nota** A seroalbumina bovina (BSA) presente nas esferas deste produto foi produzida a partir de plasma bovino proveniente exclusivamente dos EUA. Os animais não foram alimentados com nenhuma proteína de ruminante ou outra proteína animal e foram aprovados nos testes ante- e post-mortem. Durante o processamento, não houve mistura do material com outros materiais animais.
- Nota** As pipetas de transferência contêm uma marca única que representa o volume de amostra mínimo necessário para a transferência para o cartucho GeneXpert. Utilize unicamente para este fim. Todas as outras pipetas devem ser fornecidas pelo laboratório.

6.2 Conservação e manuseamento



- Conserve os cartuchos e reagentes do Xpert MTB/RIF Assay entre 2 °C e 28 °C.
- Não utilize reagentes ou cartuchos que tenham ultrapassado o prazo de validade.
- O cartucho encontra-se estável até um período máximo de 6 semanas entre 2 °C e 45 °C após a abertura da bolsa. Não abra um cartucho até que esteja pronto para testar.
- Caso utilize um instrumento GeneXpert Dx, inicie o teste no espaço de quatro horas após a adição da amostra tratada com reagente de amostra ao cartucho.
- Se utilizar um sistema GeneXpert Infinity, certifique-se de que inicia o teste e coloca o cartucho no tapete rolante no espaço de 30 minutos após a adição da amostra tratada com reagente de amostra ao cartucho. O prazo de validade restante é registado pelo sistema com o software Xpertise de modo a que os testes sejam executados antes do final do período de quatro horas no instrumento.
- Não utilize nenhum reagente que esteja turvo ou que apresente alteração da cor.

6.3 Materiais necessários mas não fornecidos

- Sistemas do instrumento GeneXpert Dx ou sistemas GeneXpert Infinity (o número de catálogo varia consoante a configuração): Instrumento GeneXpert, computador, leitor de código de barras, manual do utilizador.
 - Para o sistema GeneXpert Dx: Software GeneXpert Dx versão 4.3 ou superior
- Impressora: Caso necessite de uma impressora, contacte a assistência técnica da Cepheid para tratar da aquisição de uma impressora recomendada.
- Recipientes de colheita de amostras estanques, estéreis e de tampa roscada
- Luvas descartáveis, protecção ocular, batas e rótulos ou marcadores de tinta permanente
- Pipetas estéreis, de utilização única, com tampões estanques na extremidade para processamento de amostras
- Cronómetro

6.4 Materiais disponíveis mas não fornecidos

Controlo de execução externa INTROL™ (referência n.º TBNEG-04) como controlo negativo e controlos de execução externa INTROL™ da MMQCI (referência n.º TBWT-04 e referência n.º TBMDR1-04) como controlos positivos susceptíveis à RIF e resistentes à RIF.

7. Advertências e precauções



- Trate todas as amostras biológicas, incluindo os cartuchos usados, como sendo capazes de transmitir agentes infecciosos. Dado que é frequentemente impossível saber quais as amostras biológicas que poderão ser infecciosas, todas devem ser tratadas aplicando as precauções padrão. Orientações para o manuseamento de amostras estão disponíveis nos Centers for Disease Control and Prevention⁷ e Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards).⁸
- Use luvas de protecção descartáveis, batas e protecção ocular durante o manuseamento de amostras e reagentes. Lave muito bem as mãos após o manuseamento das amostras e dos reagentes do teste.
- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição para trabalhar com produtos químicos e manusear amostras biológicas.
- A preparação de sedimentos de expectoração digeridos, descontaminados e concentrados e os procedimentos do Xpert MTB/RIF devem ser realizados recorrendo a práticas de biossegurança de nível 2.⁹
- Utilize apenas para a detecção de membros do complexo *M. tuberculosis* utilizando sedimentos preparados seguindo os procedimentos NALC-NaOH ou NaOH recomendados pelos Centers for Disease Control and Prevention (CDC).¹⁰ Este teste pode ser utilizado apenas com amostras de expectoração em estado natural ou em sedimentos concentrados preparados a partir de expectorações induzidas ou espontânea.
- Quando processar mais do que uma amostra simultaneamente, abra apenas um cartucho, adicione a amostra tratada com reagente de amostra e feche o cartucho antes de processar a próxima amostra. Trocar de luvas entre as amostras.
- Não substitua os reagentes do Xpert MTB/RIF Assay por outros reagentes.
- Não abra a tampa do cartucho do Xpert MTB/RIF Assay, excepto quando adicionar a amostra tratada com reagente de amostra.
- Não utilize um cartucho se este parecer húmido ou se o selo da tampa parecer estar partido.
- Não utilize um cartucho que tenha caído ou sido agitado.
- Não utilizar um cartucho que tenha um tubo de reacção danificado.



- Cada cartucho de utilização única do Xpert MTB/RIF Assay é utilizado para processar um teste. Não reutilize cartuchos gastos.
- Consulte os técnicos responsáveis pelos resíduos ambientais da sua instituição relativamente à eliminação correcta de cartuchos usados e reagentes não usados. Este material pode apresentar características de resíduos perigosos segundo a Lei federal de conservação e recuperação de recursos (RCRA — Resource Conservation and Recovery Act) da Agência de Protecção Ambiental (EPA — Environmental Protection Agency) que exijam eliminação específica. Verificar as regulamentações estaduais e locais, uma vez que estas poderão diferir das regulamentações federais de eliminação de resíduos. As instituições devem verificar os requisitos de eliminação de resíduos perigosos dos respectivos países.



- O reagente de amostra contém hidróxido de sódio (pH > 12,5) (códigos internacionais de perigos de natureza química H303, H314), que pode ser irritante para os olhos e a pele e exige protecção ocular e cutânea. O reagente de amostra também contém isopropanol (código internacional de perigo de natureza química H226), que é um líquido inflamável.
- A população co-infectada com VIH/MTB pode incluir uma maior percentagem de pacientes com amostras de esfregaço negativo com níveis de complexo MTB inferiores ao nível de detecção do ensaio.
- Os regulamentos locais, estatais e federais para a notificação de doenças reportáveis são constantemente actualizados e incluem diversos organismos para vigilância e investigações de surtos.^{11,12} Além disso, os Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recomendam que quando os agentes patogénicos de doenças reportáveis são detectados por um teste de diagnóstico independente de cultura (CIDT), o laboratório deve facilitar a obtenção do isolado ou dos materiais clínicos para envio ao laboratório de saúde pública apropriado para ajudar nas investigações ao surto e epidemiológicas. Os laboratórios são responsáveis por seguirem os respectivos regulamentos estatais e locais e devem consultar os laboratórios de saúde pública estatais e locais para conhecerem as directrizes de envio de isolados e amostras clínicas.

8. Colheita, transporte e conservação de amostras

8.1 Colheita

Proceda à colheita de amostras de expectoração em estado natural ou de sedimentos de expectoração seguindo os procedimentos padrão da sua instituição. O paciente deve estar sentado ou em pé. Consulte a Tabela 1 para definir o volume adequado da amostra.

Tabela 1. Volume necessário

Tipo de amostra	Volume mínimo para um teste	Volume total mínimo para teste e repetição do teste — Consulte a secção 11.2, Procedimento de repetição do teste
Sedimento de expectoração	0,5 ml	1 ml
Expectoração em estado natural	1 ml	2 ml

8.2 Conservação e transporte



Sedimento de expectoração: Conserve os sedimentos ressuspensos entre 2 °C e 8 °C até um período máximo de sete dias.



Expectoração em estado natural: Transporte e conserve as amostras entre 2 °C e 8 °C antes do processamento, sempre que possível. Se necessário, as amostras de expectoração podem ser conservadas a uma temperatura máxima de 35 °C até um período máximo de três dias e, de seguida, entre 2 °C e 8 °C por mais sete dias.

9. Procedimento(s) de ensaio

9.1 Amostras de sedimento de expectoração concentrado

Este procedimento destina-se a utilização com sedimentos de expectoração preparados para expectorações induzidas ou espontâneas.

Nota Rejeite amostras que contenham partículas de alimentos visíveis ou outras partículas sólidas.

Requisitos de volume: São necessários pelo menos 0,5 ml de sedimento de expectoração ressuspensão após a digestão, descontaminação e concentração para o MTB/RIF Assay. Utilize o método de Kent e Kubica⁸ e ressuspensão o sedimento num tampão fosfato/H₂O 67 mM. Depois da ressuspensão, reserve pelo menos 0,5 ml do sedimento ressuspensão para o Xpert MTB/RIF Assay.

- Use luvas de protecção descartáveis.
- Identifique cada cartucho de Xpert MTB/RIF Assay com a ID da amostra.

Nota Escreva na parte lateral do cartucho ou coloque um rótulo de identificação. Não coloque o rótulo na tampa do cartucho nem cubra o código de barras existente no mesmo.

- Transfira pelo menos 0,5 ml do sedimento ressuspensão total para um tubo cónico de tampa roscada para o Xpert MTB/RIF Assay utilizando uma pipeta de transferência. Em alternativa, pode processar a totalidade do sedimento no tubo original.



Nota Conserve os sedimentos ressuspensos entre 2 °C e 8 °C até um período máximo de sete dias.

- Utilizando uma pipeta de transferência, transfira 1,5 ml de reagente de amostra para 0,5 ml de sedimento ressuspensão. Para volumes de sedimento superiores, adicione reagente de amostra igual a três vezes o volume do sedimento ressuspensão.
- Coloque novamente a tampa no tubo, agite vigorosamente 10 a 20 vezes ou agite no vórtex durante pelo menos 10 segundos.

Nota Um movimento para a frente e para trás corresponde a uma única agitação.

- Coloque a amostra na incubadora durante um período de 15 minutos a uma temperatura entre 20 °C e 30 °C.
- Entre os 5 e 10 minutos do período de incubação, agite vigorosamente 10 a 20 vezes ou agite novamente no vórtex durante pelo menos 10 segundos.

9.2 Amostras de expectoração em estado natural

Nota Rejeite amostras que contenham partículas de alimentos visíveis ou outras partículas sólidas.

1. Use luvas de protecção descartáveis.
2. Identifique cada cartucho de Xpert MTB/RIF Assay com a ID da amostra. Ver Figura 1.

Nota Escreva na parte lateral do cartucho ou coloque um rótulo de identificação. Não coloque o rótulo na tampa do cartucho nem cubra o código de barras existente no mesmo.



Figura 1. Escrever no cartucho com um marcador permanente

3. Abra cuidadosamente a tampa do recipiente de colheita de expectoração. Ver Figura 2.



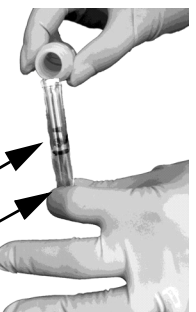
Figura 2. Abrir o recipiente da amostra

4. Verta ou pipete (a pipeta não é fornecida) aproximadamente 2 vezes o volume do reagente de amostra para a expectoração (diluição de 2:1, reagente de amostra:expectoração). Tenha atenção de modo a não permitir que o reagente de amostra entre em contacto com a pele. Ver Figura 3.



Exemplo 1

8 ml de reagente de amostra;
4 ml de expectoração



Linha de 3 ml
1 ml de expectoração

Exemplo 2

2 ml de reagente de amostra;
1 ml de expectoração

Nota: Deposite o reagente de amostra remanescente e o frasco num recipiente para resíduos químicos.

Figura 3. Exemplos de diluições 2:1

5. Recoloque e aperte bem a tampa.
6. Agite vigorosamente 10 a 20 vezes ou leve ao vórtice durante pelo menos 10 segundos.

Nota Um movimento para a frente e para trás corresponde a uma única agitação.

7. Coloque a amostra na incubadora durante um período de 15 minutos a uma temperatura entre 20 °C e 30 °C.
8. Entre os 5 e 10 minutos do período de incubação, agite vigorosamente 10 a 20 vezes ou agite no vórtex durante pelo menos 10 segundos.

9.3 Preparação do cartucho

Importante Caso utilize um instrumento GeneXpert Dx, inicie o teste no espaço de quatro horas após a adição da amostra tratada com reagente de amostra ao cartucho. Se utilizar um sistema GeneXpert Infinity, certifique-se de que inicia o teste e coloca o cartucho no tapete rolante no espaço de 30 minutos após a adição da amostra tratada com reagente de amostra ao cartucho. O prazo de validade restante é registado pelo sistema com o software Xpertise de modo a que os testes sejam executados antes do final do período de quatro horas no instrumento.

Nota Quando processar mais do que uma amostra simultaneamente, abra apenas um cartucho, adicione a amostra tratada com reagente de amostra e feche o cartucho antes de prosseguir para a amostra seguinte. Trocar de luvas entre as amostras.

Para adicionar a amostra e os reagentes ao cartucho:

1. Abra a tampa do cartucho e depois abra o recipiente da amostra.
2. Usando a pipeta de transferência fornecida, aspire a amostra liquefeita até à linha na pipeta. Ver Figura 4. Caso haja volume de amostra insuficiente, não prossiga com o teste.



Figura 4. Aspirar até à linha na pipeta

3. Dispensando a amostra lentamente para minimizar o risco de formação de aerossol, transfira a amostra tratada com reagente da amostra para a câmara da amostra do cartucho do Xpert MTB/RIF. Ver Figura 5.



Figura 5. Dispensar a amostra liquefeita descontaminada na câmara da amostra do cartucho



4. Feche a tampa do cartucho firmemente. A amostra tratada com reagente de amostra restante pode ser mantida até um período máximo de quatro horas a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C, caso seja necessário repetir o teste.

9.4 Iniciar o teste

Importante Antes de iniciar o teste, certifique-se de que o sistema está a executar o software GeneXpert versão 4.3 ou superior e de que o ficheiro de definição do Xpert MTB/RIF Assay é importado para o software.

Esta secção discrimina os passos básicos para realizar o teste. Para obter instruções detalhadas, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* ou o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Infinity*.

Nota Os passos a seguir poderão ser diferentes se o administrador do sistema tiver alterado o fluxo de trabalho predefinido do sistema.

1. Ligue o sistema do instrumento GeneXpert.
 - Se estiver a utilizar o instrumento GeneXpert Dx, comece por ligar o instrumento GeneXpert Dx e, de seguida, o computador. O software GeneXpert inicia automaticamente ou pode ser necessário clicar duas vezes no ícone de atalho do software GeneXpert Dx no ambiente de trabalho do Windows®.
 - ou
 - Caso utilize o instrumento GeneXpert Infinity, ligue a alimentação do instrumento. No ambiente de trabalho do Windows, faça um duplo clique no ícone de atalho do software Xpertise.
2. Inicie sessão no software do sistema do instrumento GeneXpert utilizando o seu nome de utilizador e palavra-passe.
3. Na janela do sistema GeneXpert, clique em **Criar teste** (GeneXpert Dx) ou **Orders (Encomendas)** e em **Order Test (Encomendar teste)** (Infinity).
4. Leia ou introduza a ID do paciente (opcional). Se digitar a ID do paciente, assegure-se de que digita a ID do paciente correcta. A ID do paciente é associada aos resultados do teste e é mostrada na janela Ver resultados.
5. Leia ou introduza a ID da amostra. Se introduzir a ID da amostra, assegure-se de que introduz a ID da amostra correcta. A ID da amostra é associada aos resultados do teste e é mostrada na janela Ver resultados e em todos os relatórios. É visualizada a caixa de diálogo Ler código de barras do cartucho.
6. Leia o código de barras do cartucho do Xpert MTB/RIF Assay. Aparece a janela Criar teste. Utilizando a informação do código de barras, o software preenche automaticamente as caixas dos seguintes campos: Seleccionar ensaio, ID do lote de reagente, N.º de série do cartucho e Prazo de validade.

Nota Se o código de barras no cartucho do Xpert MTB/RIF Assay não puder ser lido digitalmente, repita o teste com um novo cartucho.

7. Clique em **Iniciar teste** (GeneXpert Dx) ou **Submit (Enviar)** (Infinity). Introduza a sua palavra-passe se lhe for solicitada.
8. Para o Sistema GeneXpert Infinity: coloque o cartucho no tapete rolante. O cartucho será automaticamente carregado, o teste será executado e o cartucho usado será colocado no recipiente para resíduos.
 - ou
 - Para o instrumento GeneXpert Dx:
 - A. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e carregue o cartucho.
 - B. Feche a porta. O teste tem início e a luz intermitente verde altera-se para verde constante. Quando o teste termina, a luz desliga-se.
 - C. Espere até que o sistema destranque o fecho da porta antes de abrir a porta do módulo e retirar o cartucho.
 - D. Os cartuchos usados devem ser eliminados nos recipientes apropriados para resíduos de amostras, de acordo com as práticas padrão da sua instituição.

9.5 Visualização e impressão de resultados

Esta secção discrimina as etapas básicas para a visualização e a impressão dos resultados. Para obter instruções detalhadas adicionais sobre a visualização e a impressão dos resultados, consulte o *Manual do utilizador do GeneXpert Dx System* ou o *Manual do utilizador do GeneXpert Infinity System*.

1. Clique no ícone **Ver resultados** para visualizar os resultados.
2. Após a conclusão do teste no espaço de aproximadamente 2 horas, clique no botão **Comunicar** do ecrã Ver resultados para visualizar e/ou gerar um ficheiro de relatório em formato pdf.

10. Controlo da qualidade

CONTROL

Cada teste inclui um controlo de processamento da amostra (SPC) e um controlo de verificação da sonda (PCC).

Controlo de processamento da amostra (SPC) – Assegura que a amostra foi bem processada. O SPC contém esporos não infecciosos, sob a forma de um bolo seco de esporos que está incluído em cada cartucho para verificar o processamento adequado do MTB. O SPC verifica se ocorreram condições para a lise do MTB se os organismos estiverem presentes e verifica se o processamento da amostra é adequado. Além disso, este controlo detecta inibição associada à amostra das reacções de PCR em tempo real e actua como controlo interno positivo.

O SPC deve ser positivo em amostras negativas do MTB e pode ser negativo ou positivo em amostras positivas. O SPC é aprovado se preencher os critérios de aceitação validados. O resultado do teste será **Invalid (Inválido)** se o SPC não for detectado numa amostra negativa do MTB.

Controlo de verificação da sonda (PCC, QC1, QC2) – Antes do início da primeira e da segunda reacções do ensaio de PCR “nested”, o sistema do instrumento GeneXpert mede o sinal de fluorescência das sondas QC1 e QC2 (reacção 1) e as sondas *rpoB* e SPC (reacção 2) para monitorizar a reidratação das esferas, o enchimento do tubo de reacção, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. O PCC é aprovado se preencher os critérios de aceitação validados.

Controlos externos

O controlo de execução externa INTRON™ da MMQCI (Maine Molecular Quality Controls, Inc.) (referência n.º TBNEG-04) como controlo negativo e os controlos de execução externa INTRON™ da MMQCI (referência n.º TBWT-04 e referência n.º TBMDR1-04) como controlos positivos susceptíveis à RIF e resistentes à RIF podem ser utilizados para fins de formação, testes de proficiência e controlo de qualidade externa. Devem ser utilizados controlos externos de acordo com as exigências de organizações de acreditação locais, estaduais e federais, conforme aplicável.

11. Interpretação dos resultados

O sistema do instrumento GeneXpert produz os resultados a partir dos sinais fluorescentes medidos e de algoritmos de cálculo incorporados. Os resultados podem ser vistos na janela Ver resultados. Consulte Figura 6, Figura 7, Figura 8 e Figura 9 para obter exemplos específicos e consulte a Tabela 2 para obter uma lista de todos os resultados possíveis.

Tabela 2. Resultados e interpretações do Xpert MTB/RIF Assay Id

Resultado	Interpretação
MTB DETECTED (MTB DETECTADO); Rif Resistance DETECTED (Resistência à Rif DETECTADA) (Figura 6)	O alvo de MTB é detectado dentro da amostra: <ul style="list-style-type: none"> Foi detectada uma mutação <i>no gene rpoB</i>. SPC: NA (não aplicável). Não é necessário um sinal do SPC pois a amplificação do MTB pode competir com este controlo. Verificação da sonda (QC1 e QC2): PASS (APROVADO). Aprovados todos os resultados de verificação da sonda.
MTB DETECTED (MTB DETECTADO); Rif Resistance NOT DETECTED (Resistência à Rif NÃO DETECTADA) (Figura 7)	O alvo de MTB é detectado dentro da amostra: <ul style="list-style-type: none"> Não foi detectada qualquer mutação no gene <i>rpoB</i>. SPC: NA (não aplicável). Não é necessário um sinal do SPC pois a amplificação do MTB pode competir com este controlo. Verificação da sonda (QC1 e QC2): PASS (APROVADO). Aprovados todos os resultados de verificação da sonda.
MTB DETECTED (MTB DETECTADO); Rif Resistance INDETERMINATE (Resistência à Rif INDETERMINADA) (Figura 8)	O alvo de MTB é detectado dentro da amostra: <ul style="list-style-type: none"> Não foi possível determinar uma mutação no gene <i>rpoB</i> devido à detecção insuficiente do sinal. SPC: NA (não aplicável). Não é necessário um sinal do SPC pois a amplificação do MTB pode competir com este controlo. Verificação da sonda (QC1 e QC2): PASS (APROVADO). Aprovados todos os resultados de verificação da sonda.

Tabela 2. Resultados e interpretações do Xpert MTB/RIF Assay Id (Continuação)

Resultado	Interpretação
MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO) (Figura 9)	<p>O alvo de MTB não é detectado dentro da amostra.</p> <ul style="list-style-type: none"> • SPC: PASS (APROVADO). O SPC preenche os critérios de aceitação. • Verificação da sonda (QC1 e QC2): PASS (APROVADO). Aprovados todos os resultados de verificação da sonda.
INVALID (INVÁLIDO) (Figura 10)	<p>Não foi possível determinar a presença ou ausência do MTB. O SPC não cumpre os critérios de aceitação, a amostra não foi processada adequadamente ou a PCR foi inibida. Repita o teste. Consulte a secção 11.2, Procedimento de repetição do teste.</p> <ul style="list-style-type: none"> • MTB INVALID (MTB INVÁLIDA): Não foi possível determinar a presença ou ausência de ADN do MTB. • SPC: FAIL (NÃO APROVADA). O resultado do alvo de MTB é negativo e o Ct do SPC não se encontra dentro do intervalo válido. • Verificação da sonda (QC1 e QC2): PASS (APROVADO). Aprovados todos os resultados de verificação da sonda.
ERROR (ERRO)	<p>Não foi possível determinar a presença ou ausência do MTB. Repita o teste. Consulte a secção 11.2, Procedimento de repetição do teste.</p> <ul style="list-style-type: none"> • MTB: NO RESULT (SEM RESULTADO) • SPC: NO RESULT (SEM RESULTADO) • Verificação da sonda (QC1 e QC2): PASS/FAIL (APROVADA/NÃO APROVADA) <p>A falha da verificação da sonda pode ser a fonte do erro, porém, podem ocorrer outros erros como falha do componente do sistema, mesmo que a verificação da sonda seja aprovada.</p>
NO RESULT (SEM RESULTADO)	<p>Não foi possível determinar a presença ou ausência do MTB. Repita o teste. Consulte a secção 11.2, Procedimento de repetição do teste. NO RESULT (SEM RESULTADO) indica que os dados colhidos foram insuficientes. Por exemplo, o utilizador parou um teste que estava a decorrer.</p> <ul style="list-style-type: none"> • MTB: NO RESULT (SEM RESULTADO) • SPC: NO RESULT (SEM RESULTADO) • Verificação da sonda (QC1 e QC2): NA (não aplicável).

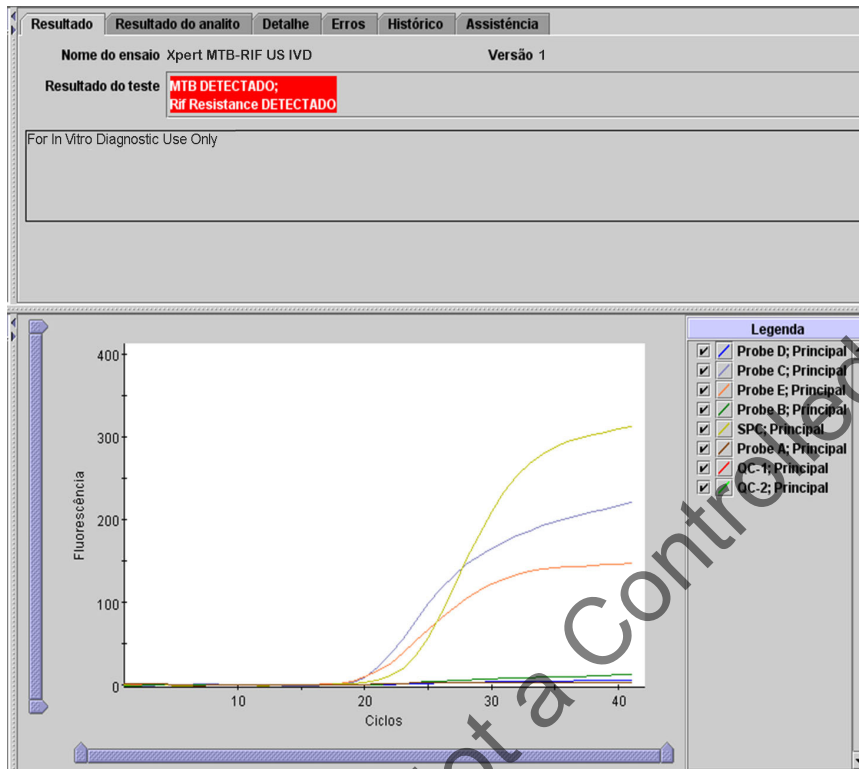


Figura 6. Exemplo de um resultado MTB DETECTED (MTB DETECTADO); Rif Resistance DETECTED (Resistência à Rif DETECTADA)

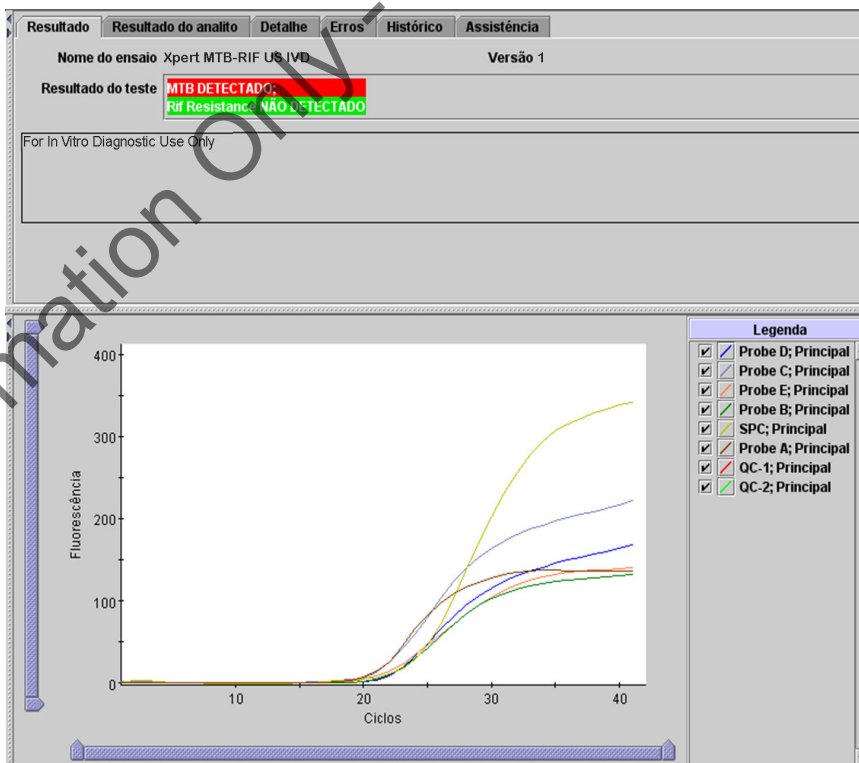


Figura 7. Exemplo de um resultado MTB DETECTED (MTB DETECTADO); Rif Resistance NOT DETECTED (Resistência à Rif NÃO DETECTADA)

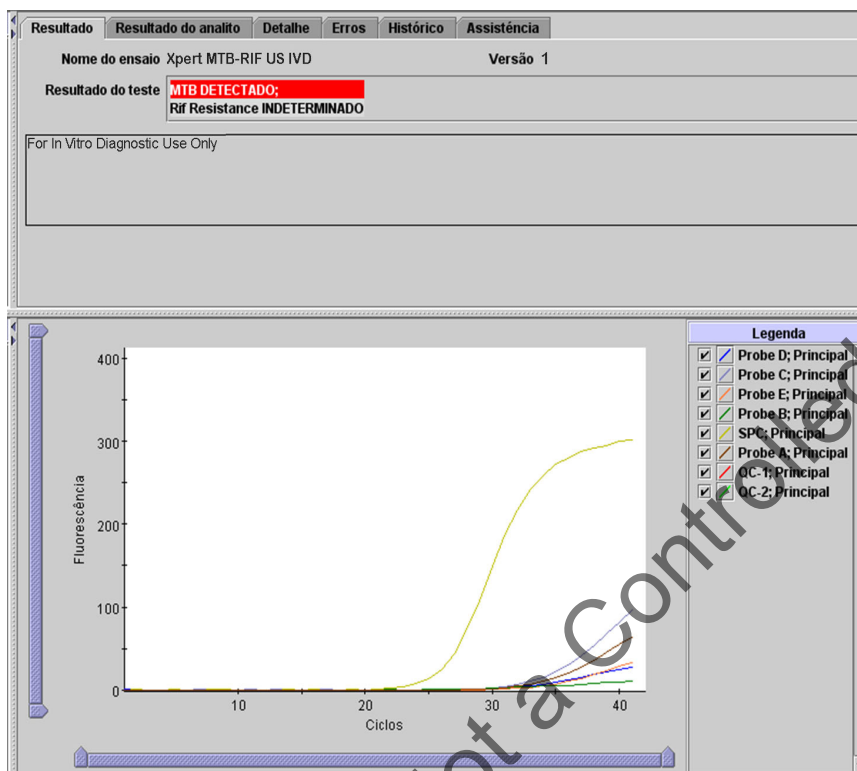


Figura 8. Exemplo de um resultado MTB DETECTED (MTB DETECTADO); Rif Resistance INDETERMINATE (Resistência a Rif INDETERMINADA)

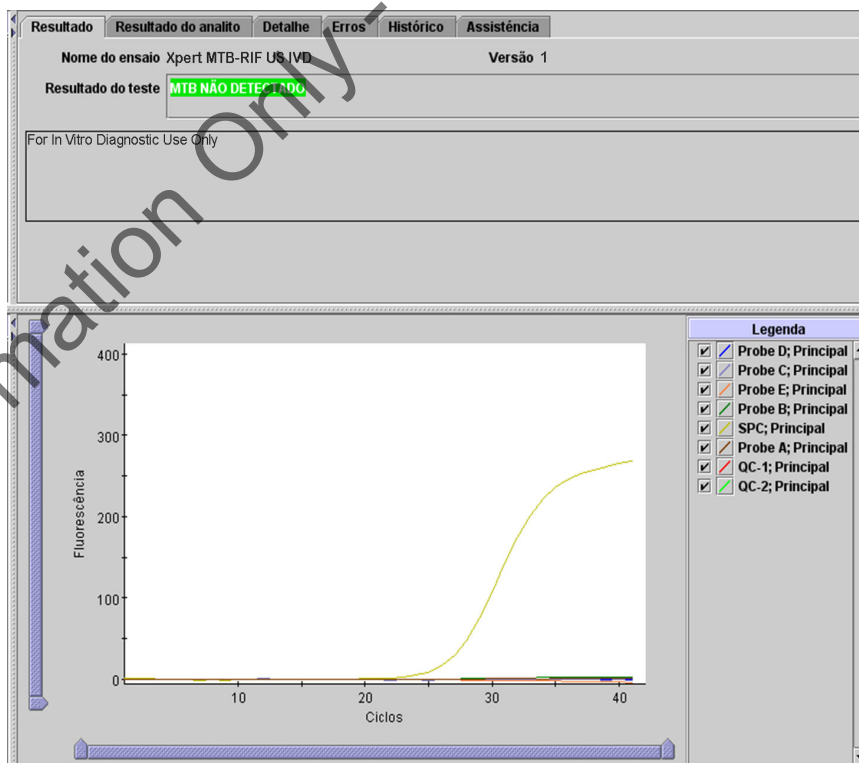


Figura 9. Exemplo de um resultado MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO)

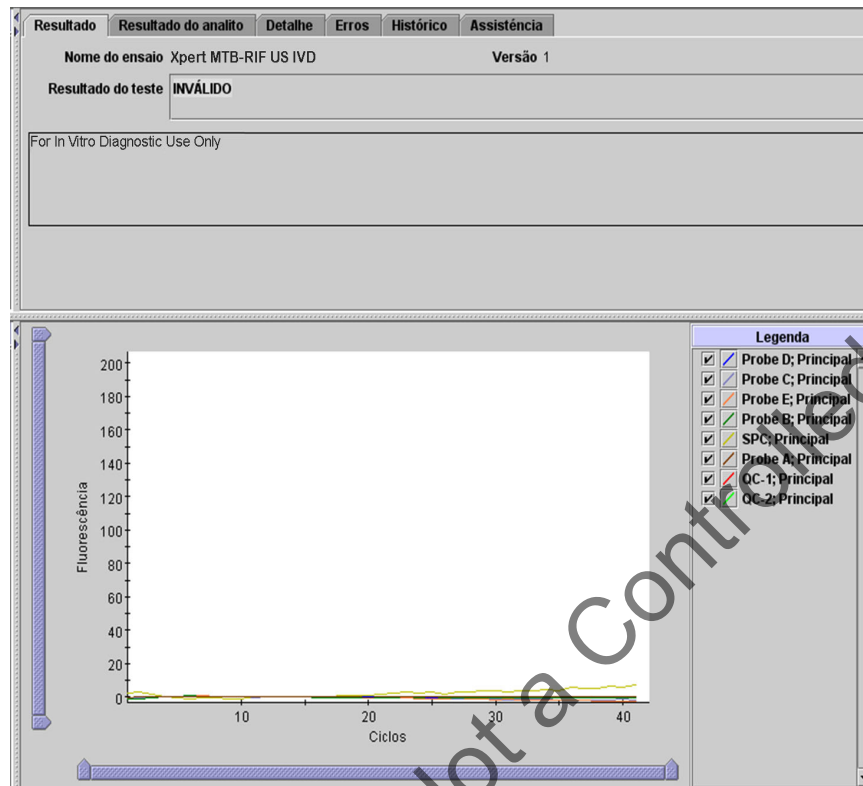


Figura 10. Exemplo de um resultado INVALID (INVÁLIDO)

11.1 Motivos para repetir o teste

Repetir o teste usando um novo cartucho se ocorrer um dos seguintes resultados do teste:

- Um resultado **INVALID (INVÁLIDO)** indica que o SPC falhou. A amostra não foi processada adequadamente ou a PCR foi inibida.
- Um resultado **ERROR (ERRO)** indica que o PCC (QC1 ou QC2) falhou ou ocorreu uma falha do sistema e o ensaio foi abortado. A causa dos erros deve-se, possivelmente, ao enchimento incorrecto do tubo de reacção, à detecção de um problema na integridade do reagente de sonda, aos limites máximos de pressão terem sido excedidos ou por ter ocorrido uma falha num módulo do GeneXpert.
- **NO RESULT (SEM RESULTADO)** indica que os dados colhidos foram insuficientes. Por exemplo, o utilizador parou um teste que estava a decorrer.

11.2 Procedimento de repetição do teste

Caso exista sedimento de expectoração reconstituído ou expectoração em estado natural remanescentes, utilize sempre reagente de amostra novo para tratar a expectoração antes de executar o ensaio. Consulte a secção 9.1, Amostras de sedimento de expectoração concentrado ou a secção 9.2, Amostras de expectoração em estado natural.

Caso disponha de amostra tratada com reagente de amostra restante suficiente e esteja dentro do período de preparação de quatro horas, pode utilizar a amostra restante para preparar e processar um novo cartucho de imediato no instrumento GeneXpert.

Nota

Se utilizar um instrumento Infinity, a repetição do teste deve ser iniciada nos módulos denominados como módulos STAT reservados.

Ao repetir o teste, use sempre um novo cartucho. Consulte a secção 9.3, Preparação do cartucho.

12. Limitações

- O desempenho do Xpert MTB/RIF Assay foi avaliado utilizando expectorações induzidas ou espontâneas. O teste de outras amostras clínicas (p. ex., sangue, LCR, aspirado gástrico, fezes, tecidos e urina) não foi avaliado e pode alterar o desempenho do teste.
- Os sedimentos de expectoração concentrados utilizados durante a avaliação do desempenho do Xpert MTB/RIF Assay foram preparados seguindo os procedimentos com NALC-NaOH ou NaOH recomendados pelos Centers for Disease Control and Prevention (CDC).⁸ A utilização de outros métodos de preparação do sedimento pode alterar o desempenho do teste.
- O Xpert MTB/RIF Assay não está indicado para ser utilizado com amostras de expectoração provenientes de pacientes que estejam em tratamento com fármacos anti-tuberculose, tanto para determinar a cura bacteriológica como para monitorizar a resposta à terapêutica.
- Um teste negativo não exclui a possibilidade de isolar o complexo MTB a partir de uma amostra de expectoração. O Xpert MTB/RIF Assay deve ser utilizado em conjunto com cultura micobacteriana para abordar o risco de resultados falso-negativos e para recuperar o organismo para posterior caracterização e teste de susceptibilidade.
- Um resultado positivo do teste não indica necessariamente a presença de organismos viáveis.
- O Xpert MTB/RIF Assay não efectua a distinção entre as espécies do complexo MTB (ou seja *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedi*, *M. mungi* e *M. orygis*). Além disso, deve também ser efectuada cultura para determinar se estão presentes micobactérias diferentes das do complexo de tuberculose (MOTT) para além do complexo MTB.
- Pode observar-se uma sensibilidade mais baixa em doentes pediátricos devido à natureza difusa da infecção pulmonar por MTB neste grupo de doentes, e a dificuldades encontradas na obtenção de amostras adequadas.
- Devido à baixa prevalência de TB resistente à rifampicina nos Estados Unidos da América e às implicações da resistência à rifampicina para o tratamento, todas as estirpes do complexo MTB determinadas como sendo resistentes à rifampicina pelo Xpert MTB/RIF Assay devem ter a presença de mutações associadas à resistência à rifampicina do gene *rpoB* confirmada por um laboratório de referência. Devem ser realizados testes adicionais relativos à presença de mutações associadas à resistência a outros fármacos para o tratamento da TB.
- Como a detecção do complexo MTB depende do número de organismos presentes na amostra, os resultados fidedignos dependem da colheita, manuseamento e conservação correctas da amostra. Podem ocorrer resultados de teste errados devido à colheita incorrecta de amostra, não efectuada de acordo com o procedimento recomendado para colheita, problemas com o manuseamento e conservação da amostra, erro técnico, troca de amostras ou porque a concentração no material inicial era insuficiente. O cumprimento cuidadoso das instruções deste folheto é necessário para evitar resultados errados.
- O desempenho do Xpert MTB/RIF Assay não foi avaliado com amostras provenientes de pacientes pediátricos.
- O desempenho do teste Xpert MTB/RIF está dependente da proficiência e adesão do operador aos procedimentos do ensaio. Os erros do procedimento do ensaio podem provocar resultados falsos-positivos ou falsos-negativos. Todos os operadores do dispositivo devem ter formação adequada para utilização do dispositivo.
- Os resultados devem ser interpretados por um profissional de saúde qualificado em conjunto com a história clínica dos pacientes, os sinais e sintomas clínicos e os resultados de outros testes de diagnóstico.
- A interferência no ensaio pode ser observada na presença de lidocaína (> 20% v/v), mucina (> 1,5% p/v), etambutol (> 5 µg/ml), guaifenesina (> 2,5 mg/ml), fenilefrina (> 25% v/v) ou óleo da árvore do chá (> 0,008% v/v).
- Estudos demonstraram que o *M. scrofulaceum*, quando testado numa concentração de 10⁸ UFC/ml produziu um resultado falso-positivo no Xpert MTB/RIF Assay.
- Mutações ou polimorfismos nas regiões de ligação do iniciador ou da sonda podem afetar a detecção de estirpes novas ou desconhecidas de MTB-MR ou resistentes à RIF, originando resultados falsos negativos ou resultados de falsa resistência em estirpes suscetíveis à rifampicina.

13. Valores esperados de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay

A probabilidade de um resultado positivo do teste ser um resultado positivo fidedigno variará com base na prevalência da tuberculose na população submetida a teste e se o esfregaço de BAR for positivo ou negativo.

Em duas avaliações clínicas prospectivas multicêntricas do desempenho do Xpert MTB/RIF Assay em sujeitos oriundos dos Estados Unidos da América com suspeita de TB activa, a prevalência global de doença confirmada em cultura foi de 13,2%. Dos sujeitos com TB confirmada na cultura, 71,6% apresentaram amostras de esfregaço de BAR positivas.

13.1 Valores preditivos para um resultado do Xpert MTB/RIF Assay

Os valores preditivos positivos e negativos hipotéticos estimados da detecção do MTB para diferentes taxas de prevalência para a detecção do MTB utilizando o Xpert MTB/RIF Assay são apresentados na Tabela 3. Estes cálculos baseiam-se nas prevalências hipotéticas e na sensibilidade geral e especificidade (comparativamente à cultura) observadas durante estudos clínicos multicêntricos. A sensibilidade do Xpert MTB/RIF Assay para amostras de esfregaço de BAR positivas foi de 99,4% (479/482) e a sensibilidade para amostras de esfregaço de BAR negativas foi de 67,2% (135/201). A especificidade global do Xpert MTB/RIF Assay foi de 98,7% (1355/1373). A prevalência de MTB foi de 11,8% no primeiro estudo prospectivo realizado nos EUA e de 14,2% no segundo estudo prospectivo realizado nos EUA.

Tabela 3. Valores preditivos hipotéticos de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB

Prevalência da cultura do MTB positiva	Probabilidade da cultura do MTB positiva entre		Probabilidade da cultura do MTB negativa entre
	Esfregaço de BAR pos. Xpert MTB/RIF DETECTED (MTB/RIF DETECTADO)	Esfregaço de BAR neg. Xpert MTB/RIF DETECTED (MTB/RIF DETECTADO)	Xpert MTB/RIF NOT DETECTED (MTB/RIF NÃO DETECTADO)
1%	89,69%	13,67%	99,90%
2%	94,61%	24,24%	99,80%
3%	96,38%	32,65%	99,70%
4%	97,29%	39,51%	99,59%
5%	97,84%	45,20%	99,48%
10%	98,97%	63,52%	98,91%
11,8%	99,14%	67,71%	98,70%
14,2%	99,30%	72,18%	98,39%
20%	99,54%	79,67%	97,59%
40%	99,83%	91,27%	93,82%
50%	99,88%	94,00%	91,01%

13.2 Valores preditivos baseados em dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay

Os valores preditivos positivos e negativos hipotéticos estimados da detecção do MTB para diferentes taxas de prevalência para a detecção do MTB utilizando dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay são apresentados na Tabela 4. Estes cálculos baseiam-se na prevalência hipotética e na sensibilidade e especificidade global (em comparação com a cultura) observadas no segundo dos dois estudos multicêntricos nos quais se realizaram dois Xpert MTB/RIF Assays em cada sujeito. A sensibilidade de dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay para amostras de esfregaço de BAR positivas foi de 100% (133/133) e a sensibilidade para amostras de esfregaço de BAR negativas foi de 69,4% (59/85). A especificidade global dos dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay foi de 97,9% (746/762).

Tabela 4. Valores preditivos hipotéticos de dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB ^a

Prevalência da cultura do MTB positiva	Probabilidade da cultura do MTB positiva entre		Probabilidade da cultura do MTB negativa entre
	Dois esfregaços de BAR pos. Xpert MTB/RIF DETECTED (MTB/RIF DETECTADO)	Dois esfregaços de BAR neg. Xpert MTB/RIF DETECTED (MTB/RIF DETECTADO)	Dois Xpert MTB/RIF NOT DETECTED (MTB/RIF NÃO DETECTADO)
1%	84,40%	9,19%	99,91%
2%	91,62%	16,98%	99,82%
3%	94,31%	23,66%	99,72%
4%	95,71%	29,46%	99,63%
5%	96,57%	34,54%	99,53%
10%	98,35%	52,69%	99,02%
11,8%	98,62%	57,28%	98,82%
14,2%	98,88%	62,39%	98,54%
20%	99,26%	71,48%	97,81%
40%	99,72%	86,98%	94,37%
50%	99,81%	90,93%	91,79%

^a A sensibilidade de 100% para os dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay para sujeitos com amostras de esfregaço de BAR positivas foi considerada como 99,9% nesta tabela.

13.3 Valores preditivos para o resultado MTB DETECTED (MTB DETECTADO), RIF Resistance DETECTED (Resistência à RIF DETECTADA) de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay

Os valores preditivos hipotéticos estimados para o resultado **MTB Detected (MTB Detectado), RIF Resistance DETECTED (Resistência à RIF DETECTADA)** para diferentes taxas de prevalência de sujeitos com cultura positiva do MTB e diferentes taxas de prevalência de resistência à RIF entre sujeitos com cultura positiva do MTB são apresentados na Tabela 5. Estes cálculos baseiam-se em prevalências hipotéticas e na sensibilidade e especificidade geral (comparativamente ao teste fenotípico de susceptibilidade a fármacos [DST]) observadas durante o primeiro de dois estudos clínicos multicêntricos. A sensibilidade de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay para a detecção da resistência à RIF foi de 94,7% (18/19) e a especificidade foi de 99,0% (404/408). A prevalência de TB no estudo prospectivo nos EUA foi de 11,8%. Na população dos EUA com TB, a prevalência de resistência à rifampicina é de aproximadamente 1,8%.⁵

Tabela 5. Valores preditivos hipotéticos de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. DST

Prevalência da cultura do MTB positiva	Prevalência de resistência à RIF entre culturas positivas do MTB	Probabilidade de resistência à RIF entre resultados "MTB DETECTED RIF Resistance DETECTED" (MTB DETECTADO, resistência à RIF DETECTADA) do Xpert	Porcentagem de Resultados MTB DETECTED RIF Resistance DETECTED (MTB DETECTADO, resistência à RIF DETECTADA) do Xpert na população	Probabilidade de resistência à RIF entre resultados MTB DETECTED, RIF Resistance NOT DETECTED (MTB DETECTADO, resistência à RIF NÃO DETECTADA) do Xpert
5%	1,0%	48,4%	0,09%	0,04%
	1,5%	58,6%	0,11%	0,06%
	2,0%	65,5%	0,13%	0,08%
	10%	91,2%	0,47%	0,45%
	50%	98,9%	2,17%	3,39%
11,8%	1,0%	48,4%	0,21%	0,05%
	1,5%	58,6%	0,26%	0,07%
	2,0%	65,5%	0,31%	0,10%
	10%	91,2%	1,11%	0,51%
	50%	98,9%	5,11%	4,16%
20%	1,0%	48,4%	0,35%	0,05%
	1,5%	58,6%	0,44%	0,07%
	2,0%	65,5%	0,52%	0,10%
	10%	91,2%	1,88%	0,54%
	50%	98,9%	8,66%	4,46%

14. Características do desempenho – Desempenho clínico

14.1 Estudo 1

14.1.1 Desenho do estudo

As características do desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para a detecção do ADN do complexo MTB e para a detecção de resistência à RIF em amostras de expectoração comparativamente aos resultados de cultura (sólida e/ou líquida), seguidos por testes de susceptibilidade a fármacos (DST) foram determinadas num estudo multicêntrico (Estudo 1) recorrendo a amostras de expectoração prospectivas e arquivadas colhidas em populações residentes dentro e fora dos EUA. Foi testada uma única amostra de expectoração ou sedimento concentrado restante, de acordo com as normas de cuidados, preparado a partir de expectorações induzidas ou espontâneas pelo Xpert MTB/RIF Assay em sujeitos do estudo suspeitos de tuberculose. Todos os esfregaços de BAR foram realizados em sedimentos concentrados.

Foram elegíveis para o Estudo 1 amostras provenientes de sujeitos com idade igual ou superior a 18 anos, caso se suspeitasse que sofriam de tuberculose pulmonar, sem estarem em tratamento para a TB ou com menos de três dias de tratamento, com volume suficiente para teste no Xpert MTB/RIF Assay e com resultados do esfregaço de BAR, cultura de MTB e teste fenotípico de susceptibilidade a fármacos (DST). Das 1126 amostras elegíveis e testadas pelo Xpert MTB/RIF Assay, 1096 foram utilizadas na análise. Trinta amostras foram excluídas da análise; 13 amostras devido a resultados não determinados no Xpert MTB/RIF Assay (ou seja, INVALID (Inválido), ERROR (Erro) ou NO RESULT (Sem resultado)) e 17 amostras devido a contaminação da cultura do MTB.

As amostras foram colhidas em sujeitos do estudo com idade ≥ 18 anos, 62% (n = 679) do sexo masculino e 36% (n = 396) do sexo feminino; para 1,9% (n = 21) o sexo era desconhecido. Foram provenientes de regiões geograficamente diversificadas: 49% (n = 542) originários dos EUA (Califórnia, Nova Iorque e Florida) e 51% (n = 554) de fora dos EUA (Vietname, Peru, África do Sul, México e Bangladeche). Das 542 amostras colhidas nos EUA, 450 foram colhidas prospectivamente e 92 foram colhidas a partir de um banco de arquivamento de amostras; das 554 amostras colhidas fora dos EUA, 23 foram colhidas prospectivamente e 531 foram colhidas a partir de um banco de arquivamento de amostras.

14.1.2 Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB

Uma a três das amostras de expectoração foram colhidas em cada sujeito do estudo para utilização no estudo clínico (33,9% dos sujeitos do estudo registaram 1 amostra de expectoração colhida, 44,2% 2 amostras de expectoração e 22,0% registaram 3 amostras de expectoração). Se tivesse sido colhida mais de uma amostra num sujeito, era testada a primeira amostra com volume suficiente no Xpert MTB/RIF Assay. Se o resultado do ensaio fosse não determinado (ou seja, Error (Erro), Invalid (Inválido) ou No Result (Sem resultado)), a mesma amostra era repetida caso existisse volume suficiente. Em geral, 1,2% das amostras testadas (13/1126; IC de 95%: 0,7% a 2,0%) foram não determinadas. Entre os 1096 sujeitos com resultados de cultura do MTB, foi obtido um resultado no Xpert MTB/RIF Assay com a primeira amostra para 85,5% dos sujeitos, com a segunda amostra para 11,2% dos sujeitos e com a terceira amostra para 0,3% dos sujeitos. O estado do esfregaço de BAR para um sujeito foi determinado pelo resultado do esfregaço de BAR a partir da amostra com um resultado do Xpert MTB/RIF Assay correspondente. O estado da cultura do MTB para um sujeito foi definido com base no resultado da cultura do MTB de todas as amostras para este sujeito.

O desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para a detecção do MTB relativamente à cultura do MTB, estratificado segundo o estado do esfregaço de BAR é apresentado na Tabela 6 e na Tabela 7. Resultados discordantes para a cultura positiva do MTB e resultados **MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO)** no Xpert MTB/RIF Assay foram posteriormente avaliados recorrendo ao sequenciamento bidireccional da região do *rpoB* do genoma do MTB. Não foi efectuada nenhuma análise discordante nas amostras de cultura do MTB negativas.

Tabela 6. Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB para sujeitos com esfregaço de BAR positivo

		Cultura		
		+	-	Total
Xpert MTB/ RIF Assay	MTB DETECTED (MTB DETECTADO)	350	1 ^a	351
	MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO)	1 ^b	65	66
	Total	351	66	417
Sensibilidade = 99,7% (350/351) com IC de 95%: 98,4%–99,9%				
Especificidade = 98,5% (65/66) com IC de 95%: 91,9%–99,7%				

^a O Xpert MTB/RIF Assay detectou MTB numa amostra registada como cultura do MTB negativa. O resultado da cultura baseou-se numa amostra de expectoração para este sujeito.

^b Não foi detectada uma amostra de cultura do MTB positiva pelo Xpert MTB/RIF Assay. Este isolado da cultura foi determinado como sendo MTB através de uma análise de sequenciamento bidireccional.

Tabela 7. Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB para sujeitos com esfregaço de BAR negativo

		Cultura		
		+	-	Total
Xpert MTB/ RIF Assay	MTB DETECTED (MTB DETECTADO)	89	7 ^a	96
	MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO)	28 ^b	555	583
	Total	117	562	679
Sensibilidade = 76,1% (89/117) com IC de 95%: 67,6%–82,9%				
Especificidade = 98,8% (555/562) com IC de 95%: 97,5%–99,4%				

^a O Xpert MTB/RIF Assay detectou MTB em sete amostras registadas como cultura do MTB negativa. Os resultados da cultura basearam-se numa amostra de expectoração para três sujeitos, em duas amostras de expectoração para dois sujeitos e em três amostras de expectoração para dois sujeitos.

^b Não foram detectadas pelo Xpert MTB/RIF Assay vinte e oito amostras de cultura do MTB positivas. Estes isolados da cultura foram determinados como sendo MTB através de uma análise de sequenciamento bidireccional.

A sensibilidade geral depende da percentagem de sujeitos com esfregaço de BAR positivo entre os sujeitos com cultura do MTB positiva. Para as amostras colhidas prospectivamente dos sujeitos oriundos dos EUA do Estudo 1, esta percentagem foi de 75,5% e a sensibilidade global foi de 93,8%. A especificidade geral foi de 98,7% (IC de 95%: 97,5%–99,4%).

Em utilização clínica, a sensibilidade geral variará, dependendo da percentagem de pacientes com esfregaços de BAR positivos para a tuberculose na população submetida a teste; a sensibilidade geral será inferior numa população submetida a teste onde a probabilidade de existirem esfregaços de BAR positivos para a tuberculose for mais baixa, por ex., uma população de pacientes com uma prevalência de co-infecção por VIH mais elevada.

14.1.3 Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB por método de colheita

O desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para a detecção do MTB foi determinado relativamente à cultura do MTB em amostras de expectoração espontâneas ou induzidas. Os resultados são apresentados na Tabela 8 e na Tabela 9. Das 1096 amostras, 535 eram amostras espontâneas, 234 amostras induzidas e 327 apresentavam um método de colheita desconhecido.

Tabela 8. Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB (expectoração induzida)

	Sujeitos com esfregaço de BAR positivo	Sujeitos com esfregaço de BAR negativo
Sensibilidade	99,6% (271/272) IC de 95%: 97,9% - 99,9%	79,0% (75/95) IC de 95%: 69,7% - 85,9%
Especificidade	97,6% (164/168) IC de 95%: 94,0% - 99,1%	

Tabela 9. Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB (induzida)

	Sujeitos com esfregaço de BAR positivo	Sujeitos com esfregaço de BAR negativo
Sensibilidade	100% (15/15) IC de 95%: 79,6% - 100%	40,0% (4/10) IC de 95%: 16,8% - 68,7%
Especificidade	99,0% (207/209) IC de 95%: 96,6% - 99,7%	

14.1.4 Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura por tipo de amostra

O desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para a detecção do MTB foi determinado relativamente à cultura do MTB em expectoração em estado natural e em amostras de sedimento de expectoração concentrado. Os resultados são apresentados na Tabela 10 e na Tabela 11. Entre as 1096 amostras, registaram-se 606 amostras de expectoração em estado natural e 490 amostras de sedimento de expectoração concentrado.

Tabela 10. Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB (expectoração em estado natural)

	Sujeitos com esfregaço de BAR positivo	Sujeitos com esfregaço de BAR negativo
Sensibilidade	99,7% (285/286) IC de 95%: 98,0% - 99,9%	79,4% (77/97) IC de 95%: 70,3% - 86,2%
Especificidade	97,8% (218/223) IC de 95%: 94,9% - 99,0%	

Tabela 11. Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. cultura do MTB (sedimento concentrado)

	Sujeitos com esfregaço de BAR positivo	Sujeitos com esfregaço de BAR negativo
Sensibilidade	100% (65/65) IC de 95%: 94,4% - 100%	60,0% (12/20) IC de 95%: 38,7% - 78,1%
Especificidade	99,3% (402/405) IC de 95%: 97,8% - 99,7%	

14.1.5 Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. teste de susceptibilidade a fármacos para RIF

Os isolados de cultura do MTB positivos foram testados relativamente à susceptibilidade a fármacos (DST) para a rifampicina utilizando os métodos de proporções em ágar com meios Middlebrook ou Lowenstein-Jensen ou o ensaio BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE. O desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para a detecção de mutações genéticas associadas à resistência à RIF foi determinado relativamente aos resultados do DST dos isolados da cultura do MTB. Dos 1096 sujeitos elegíveis e testados pelo Xpert MTB/RIF Assay, 1082 foram utilizados na análise. Catorze sujeitos foram excluídos da análise, seis sujeitos registaram resultados **MTB DETECTED, Rif Resistance INDETERMINATE (MTB DETECTADO, resistência à Rif INDETERMINADA)** no Xpert MTB/RIF Assay e oito sujeitos com culturas do MTB positivas não registaram resultados do DST.

Os resultados para a detecção de resistência à RIF associados às mutações são reportados pelo Xpert MTB/RIF Assay apenas quando o complexo MTB foi detectado pelo dispositivo. Os resultados discordantes foram posteriormente analisados recorrendo ao sequenciamento bidireccional da região *rpoB* do genoma do MTB. Os resultados globais são reportados na Tabela 12.

Tabela 12. Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay vs. DST

		DST			Total
		Resistente à RIF	Susceptível à RIF	DST não efectuado Cultura de TB negativa	
Xpert MTB/ RIF Assay	MTB DETECTED, Rif Resistance DETECTED (MTB DETECTADO, resistência à Rif DETECTADA)	18	4 ^a	0	22
	MTB DETECTED, Rif Resistance NOT DETECTED (MTB DETECTADO, resistência à Rif NÃO DETECTADA)	1 ^b	404	7	412
	MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO) ^c	2	26	620	648
	Total	21	434	627	1082
Sensibilidade: 94,7% (18/19) com IC de 95%: 75,4%–99,1% Especificidade: 99,0% (404/408) com IC de 95%: 97,5%–99,6%					

^a Das quatro amostras discordantes determinadas como sendo susceptíveis à RIF pelo DST e com **RIF resistance DETECTED (Resistência à RIF DETECTADA)** pelo Xpert MTB/RIF Assay, uma demonstrou ser susceptível à RIF e três foram resistentes à RIF através de sequenciamento bidireccional.

^b Uma amostra discordante determinada como sendo resistente à RIF pelo DST e com **RIF resistance NOT DETECTED (Resistência à RIF NÃO DETECTADA)** pelo Xpert MTB/RIF Assay foi determinada como sendo resistente à RIF através de sequenciamento bidireccional.

^c O MTB não foi detectado e, portanto, não foi possível determinar a detecção de mutações associadas a resistência à RIF.

Foram reportados resultados **RIF Resistance INDETERMINATE (Resistência à RIF INDETERMINADA)** para 1,3% (6/447, IC de 95%: 0,6%–2,9%) das amostras onde foi detectado MTB do Xpert MTB/RIF Assay em geral; 0,28% (1/351, IC de 95%: 0,01% a 1,58%) das amostras de esfregaço de BAR positivas e 5,21% (5/96; IC de 95%: 2,24% a 11,62%) das amostras de esfregaço de BAR negativas.

14.2 Estudo 2

14.2.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo multicêntrico prospectivo (Estudo 2) em diversos locais nos Estados Unidos da América, bem como em África do Sul e no Brasil. O desempenho do MTB/RIF Assay foi avaliado como uma alternativa a microscopia de fluorescência de esfregaço de BAR corado como ajuda para determinar a necessidade de isolamento respiratório contínuo em pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar activa. Os resultados do Xpert MTB/RIF Assay que testou duas amostras de expectoração de série em sujeitos do estudo com suspeita de tuberculose pulmonar activa foram comparados com os resultados de esfregaço de BAR fluorescentes das mesmas amostras; uma terceira amostra de expectoração de um sub-conjunto de sujeitos foi testada através de esfregaço BAR, mas não no Xpert MTB/RIF Assay. Cada amostra foi cultivada para complexo do MTB utilizando meios de cultura líquidos e sólidos, sendo o crescimento micobacteriano confirmado por testes de susceptibilidade ao complexo do MTB e rifampina realizados utilizando os métodos de proporções em ágar com meios Middlebrook. O Estudo 2 também foi desenvolvido para avaliar o desempenho clínico do Xpert MTB/RIF Assay utilizando amostras de expectoração colhidas prospectivamente em populações infectadas e não infectadas com VIH.

Os sujeitos do estudo com idade igual ou superior a 18 anos foram elegíveis para participação caso houvesse suspeita de tuberculose pulmonar, não estando a ser tratados ou sujeitos a tratamento de 48 horas ou menos dentro de 180 dias antes da colheita da primeira amostra de expectoração, e com identificação/documentação de estado com VIH. Os sujeitos foram incluídos na análise se produziram pelo menos duas amostras de expectoração num volume suficiente para testar com o Xpert MTB/RIF Assay, esfregaço de BAR e cultura de MTB, e existiam disponíveis resultados interpretáveis para os três métodos. Em alguns locais, foi colhida para análise uma terceira amostra com base em normas de cuidados. Dos 992 sujeitos elegíveis testados, trinta e dois sujeitos (3,2%) foram excluídos da análise: 7 devido à ausência de resultados de cultura e 3 devido a contaminação da cultura do MTB. Vinte e dois sujeitos (2,2%) foram excluídos devido a resultados não determinados no Xpert MTB/RIF Assay (i.e., **INVALID (INVÁLIDO)**, **ERROR (ERRO)** ou **NO RESULT (SEM RESULTADO)**). Por conseguinte, foram utilizados na análise 960 sujeitos com base no primeiro resultado do Xpert MTB/RIF Assay. Vinte dos 22 sujeitos excluídos da análise com base no primeiro do resultado do Xpert MTB/RIF Assay apresentaram resultados válidos na segunda amostra do teste Xpert MTB/RIF Assay, pelo que a análise baseada em duas amostras do teste Xpert MTB/RIF Assay incluiu um total de 980 sujeitos.

Os sujeitos do estudo eram 62% do sexo masculino e 38% do sexo feminino. Sessenta e cinco (65%) por cento dos sujeitos eram oriundos dos EUA e 35% de outros países. Quarenta e cinco por cento (45%) dos sujeitos do estudo tinham infecção por VIH e 55% não tinham infecção por VIH. A expectoração induzida e espontânea representou 59,6% e 33,6% das amostras, respectivamente; 7% das amostras de expectoração não foram especificadas. Vinte e oito por cento das amostras eram expectoração em estado natural e 72% eram sedimentos de expectoração concentrados.

14.2.2 Desempenho do Xpert MTB/RIF Assay como preditivo de resultados de esfregaços de BAR corados fluorescentes em série

Dos 215 sujeitos do estudo com complexo MTB confirmado por cultura (14,2% [88/618] dos sujeitos dos EUA e 37,1% [127/342] dos sujeitos de outros países), 99% dos sujeitos (97% dos sujeitos dos EUA e 100% dos sujeitos de outros países) com suspeita de tuberculose pulmonar onde o complexo do MTB foi detectado por microscopia tratada com ácido de duas ou três amostras de expectoração de série também tiveram o complexo do MTB detectado através de testes de uma única expectoração pelo Xpert MTB/RIF Assay. Os resultados do teste de duas amostras de expectoração de teste de série com o Xpert MTB/RIF Assay detectaram complexo do MTB em todos os sujeitos com esfregaço de BAR positivo (100% nos sujeitos dos EUA e 100% nos sujeitos de outros países).

Um único resultado negativo do Xpert MTB/RIF Assay previu a ausência de tuberculose pulmonar com esfregaço de BAR positivo com um valor preditivo negativo (VPN) global de 99,7% (99,6% nos sujeitos dos EUA e 100% nos sujeitos de outros países). Dois resultados negativos de série do Xpert MTB/RIF Assay previram a ausência de tuberculose pulmonar de esfregaço de BAR positivo com um VPN global de 100%.

14.2.3 Um resultado do Xpert MTB/RIF Assay como preditivo de resultados de esfregaços de BAR fluorescentes de série

A Tabela 13 e a Tabela 14 apresentam o desempenho global de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay em comparação com os resultados da cultura de MTB, estratificados por resultado de esfregaço de BAR (Tabela 13). A Tabela 14 consiste numa comparação lado a lado do desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay versus o resultado composto de dois esfregaços de BAR em sujeitos dos EUA e sujeitos de outros países (N=960).

A sensibilidade global de um Xpert MTB/RIF Assay em sujeitos com esfregaço de BAR positivo e negativo (com base em dois esfregaços de BAR) foi de 98,5% (IC de 95%: 94,6%, 99,6%) e de 54,8% (IC de 95%: 44,1%, 65,0%) respectivamente, e a especificidade global foi de 98,7% (IC de 95%: 97,5%, 99,3%). Um resultado no Xpert MTB/RIF Assay de “MTB Not Detected” (MTB não detectado) foi associado a uma probabilidade de resultados de MTB positivo em cultura/esfregaço de BAR positivo de 0,4% para sujeitos dos EUA e 0,0% para sujeitos de outros países.

Tabela 13. Desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay estratificado por dois esfregaços de BAR relativamente a cultura de MTB em sujeitos dos EUA e de outros países Sujeitos

		Cultura						Total
		Positivo			Negativo			
		Esfregaço de BAR +	Esfregaço de BAR -	Cultura global +	Esfregaço de BAR +	Esfregaço de BAR -	Cultura global -	
Xpert MTB/RIF Assay	Positivo	129	46	175	1	9	10 ^a	185
	Negativo	2	38	40	17	718	735	775
	Total	131	84	215	18 ^b	727	745	960

Desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para esfregaço positivo:

Sensibilidade: 98,5% (129/131), IC de 95%: 94,6%, 99,6%

Especificidade: 94,4% (17/18), IC de 95%: 74,2%, 99,0%

Desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para esfregaço negativo:

Sensibilidade: 54,8% (46/84), IC de 95%: 44,1%, 65,0%

Especificidade: 98,8% (718/727), IC de 95%: 97,7%, 99,4%

Prevalência da cultura do MTB positiva: 22,4% (215/960)

Prevalência da cultura do MTB positiva em sujeitos dos EUA: 14,2% (88/618)

Prevalência da cultura do MTB positiva em sujeitos de outros países: 37,1% (127/342)

Percentagem de sujeitos com esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com cultura do MTB positiva: 60,9% (131/215)

Probabilidade global de cultura do MTB positiva entre sujeitos com um resultado negativo no Xpert MTB/RIF: 5,2% (40/775), IC de 95%: 3,8%, 7,0%

Probabilidade de cultura do MTB positiva entre sujeitos com um resultado negativo no Xpert MTB/RIF (sujeitos dos EUA): 2,4% (13/539), IC de 95%: 1,4%, 4,1%

Probabilidade de cultura do MTB positiva entre sujeitos com um resultado negativo no Xpert MTB/RIF (sujeitos de outros países): 11,4% (27/236), IC de 95%: 8,0%, 16,1%

Probabilidade global de cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com um resultado negativo no Xpert MTB/RIF: 0,3% (2/775), IC de 95%: <0,1%, 0,9%

Probabilidade de cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com um resultado negativo no Xpert MTB/RIF (sujeitos dos EUA): 0,4% (2/539), IC de 95%: 0,1%, 1,3%

Probabilidade de cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com um resultado negativo no Xpert MTB/RIF (sujeitos de outros países): 0,0% (0/236), IC de 95%: 0,0%, 1,6%

^a Das 10 amostras de MTB de cultura negativas que foram positivas pelo Xpert MTB/RIF Assay, 5 desenvolveram micobactérias não tuberculosas (MNT). O complexo de MTB foi isolado e identificado utilizando métodos de normas de cuidados não associados ao protocolo do estudo em 4 das 5 amostras.

^b Das 18 amostras MTB de cultura negativas/esfregaço de BAR positivas, 14 desenvolveram MNT.

Um Xpert MTB/RIF Assay foi associado a uma sensibilidade de 81,4% (IC de 95%: 75,7%, 86,0%) para identificação de sujeitos com MTB de cultura positiva em comparação com uma sensibilidade de 60,9% (IC de 95%: 54,3%, 67,2%) para dois esfregaços de BAR.

Tabela 14. Comparação do desempenho de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay com dois esfregaços de BAR versus cultura de MTB em sujeitos dos EUA e de outros países

Um resultado do Xpert MTB/RIF Assay		Cultura			Dois esfregaços de AFB		Cultura		
		Positivo	Negativo	Total			Positivo	Negativo	Total
Xpert	Positivo	175	10	185	Esfregaço de BAR	Positivo	131	18	149
	Negativo	40	735	775		Negativo	84	727	811
	Total	215	745	960		Total	215	745	960
Sensibilidade:		81,4% (IC de 95%: 75,7, 86,0)			Sensibilidade:		60,9% (IC de 95%: 54,1, 67,5)		
Especificidade:		98,7% (IC de 95%: 97,5, 99,3)			Especificidade:		97,6% (IC de 95%: 96,2, 98,6)		
Prevalência nos EUA		14,2% (IC de 95%: 11,7, 17,2)			Prevalência nos EUA		14,2% (IC de 95%: 11,7, 17,2)		
VPP:		94,9% (IC de 95%: 87,7, 98,0)			VPP:		77,2% (IC de 95%: 66,8, 85,1)		
VPN:		97,6% (IC de 95%: 95,9, 98,6)			VPN:		95,0% (IC de 95%: 92,8, 96,5)		
Prevalência fora dos EUA		37,1% (IC de 95%: 32,2, 42,4)			Prevalência fora dos EUA:		37,1% (IC de 95%: 32,2, 42,4)		
VPP		94,3% (IC de 95%: 88,2, 97,4)			VPP		100% (IC de 95%: 94,8, 100)		
VPN		88,6% (IC de 95%: 83,9, 92,0)			VPN		79,0% (IC de 95%: 73,8, 83,5)		

Em sujeitos dos EUA, o VPN para um resultado do Xpert MTB/RIF Assay foi de 97,6% (IC de 95%: 95,9%, 98,6%) enquanto que o VPN para dois resultados de esfregaços de BAR foi de 95,0% (IC de 95%: 92,8%, 96,5%) com uma prevalência de TB em sujeitos oriundos dos EUA de 14,2%. A diferença no VPN foi de 2,6% com um IC de 95%: 1,2%, 4,2%.

14.2.4 Dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay como preditivo de resultados de esfregaços de BAR fluorescentes de série

A Tabela 15 e a Tabela 16 apresentam o desempenho global de dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay em comparação com os resultados da cultura de MTB, estratificados por resultado de esfregaço de BAR (Tabela 15). A Tabela 16 compara o desempenho de dois resultados do Xpert MTB/RIF Assays versus o resultado composto de dois esfregaços de BAR em sujeitos dos EUA e oriundos de outros países (N=980).

A sensibilidade global de dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay em sujeitos com esfregaço de BAR positivo e negativo com base em dois esfregaços de BAR foi de 100,0% (IC de 95%: 97,2%, 100,0%) e 69,4% (IC de 95%: 59,0%, 78,2%) respectivamente e a especificidade global foi de 97,9% (IC de 95%: 96,6%, 98,7%). Não se observaram quaisquer resultados de MTB de cultura positiva esfregaço de BAR positivo em sujeitos com dois resultados negativos de série no Xpert MTB/RIF Assay.

Tabela 15. Desempenho de dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay estratificado por dois esfregaços de BAR relativamente a cultura de MTB em sujeitos dos EUA e de outros países Sujeitos

		Cultura						Total
		Positivo			Negativo			
		Esfre- gaço de BAR +	Esfre- gaço de BAR -	Cultura global +	Esfre- gaço de BAR +	Esfre- gaço de BAR -	Cultura global -	
Xpert MTB/ RIF Assay	Positivo	133	59	192	1	15	16 ^a	208
	Negativo	0	26	26	17	729	746	772
	Total	133	85	218	18 ^b	744	762	980

Desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para esfregaço positivo:

Sensibilidade: 100% (133/133), IC de 95%: 97,2%, 100%
Especificidade: 94,4% (17/18), IC de 95%: 74,2%, 99,0%

Desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para esfregaço negativo:

Sensibilidade: 69,4% (59/85), IC de 95%: 59,0%, 78,2%
Especificidade: 98,0% (729/744), IC de 95%: 96,7%, 98,8%

Prevalência da cultura do MTB positiva: 22,2% (218/980)
Prevalência da cultura do MTB positiva em sujeitos dos EUA: 14,4% (91/633)
Prevalência da cultura do MTB positiva em sujeitos de outros países: 36,6% (127/347)

Percentagem de sujeitos com esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com um resultado de cultura de MTB positiva: 61,0% (133/218)

Probabilidade de cultura do MTB positiva entre sujeitos com resultados negativos no Xpert MTB/RIF: 3,4% (26/772), IC de 95%: 2,3%, 4,9%

Probabilidade de cultura do MTB positiva entre sujeitos com resultados negativos no Xpert MTB/RIF (sujeitos dos EUA): 1,5% (8/544), IC de 95%: 0,7%, 2,9%

Probabilidade de cultura do MTB positiva entre sujeitos com resultados negativos no Xpert MTB/RIF (sujeitos de outros países): 7,9% (18/228), IC de 95%: 5,1%, 12,1%

Probabilidade de cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com resultados negativos no Xpert MTB/RIF: 0,0% (0/772), IC de 95%: 0,0%, 0,5%

Probabilidade de cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com resultados negativos no Xpert MTB/RIF (sujeitos dos EUA): 0,0% (0/544), IC de 95%: 0,0%, 0,7%

Probabilidade de cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com resultados negativos no Xpert MTB/RIF (sujeitos de outros países): 0,0% (0/228), IC de 95%: 0,0%, 1,7%

^a Das 16 amostras de MTB de cultura negativas que foram positivas pelo Xpert MTB/RIF Assay, 6 desenvolveram micobactérias não tuberculosas (MNT). O complexo de MTB foi isolado e identificado utilizando métodos de normas de cuidados não associados ao protocolo do estudo em 4 das 6 amostras.

^b Das 18 amostras MTB de cultura negativas/esfregaço de BAR positivas, 14 desenvolveram MNT.

A Tabela 16 compara o desempenho de dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay e dois esfregaços de BAR na cultura do MTB. Os resultados do Xpert MTB/RIF Assay identificaram 88,1% (CI de 95%: 83,1%, 91,7%) sujeitos com cultura de MTB positiva em comparação com 61,0% (IC de 95%: 54,4%, 67,2%) dois esfregaços de BAR.

Tabela 16. Comparação do desempenho de dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay com dois esfregaços de BAR versus cultura de MTB em sujeitos dos EUA e de outros países

Um resultado do Xpert MTB/RIF Assay		Cultura			Dois esfregaços de AFB		Cultura		
		Positivo	Negativo	Total			Positivo	Negativo	Total
Xpert	Positivo	192	16	208	Esfregaço de BAR	Positivo	133	18	151
	Negativo	26	746	772		Negativo	85	744	829
	Total	218	762	980		Total	218	762	980
Sensibilidade:		88,1% (IC de 95%: 83,1, 91,7)			Sensibilidade:		61,0% (IC de 95%: 54,4, 67,2)		
Especificidade:		97,9% (IC de 95%: 96,6, 98,7)			Especificidade:		97,6% (IC de 95%: 96,3, 98,5)		
Prevalência nos EUA		14,4% (IC de 95%: 11,9, 17,3)			Prevalência nos EUA		14,4% (IC de 95%: 11,9, 17,3)		
VPP:		93,3% (IC de 95%: 86,1, 96,9)			VPP:		77,8% (IC de 95%: 67,6, 85,5)		
VPN:		98,5% (IC de 95%: 97,1, 99,3)			VPN:		94,9% (IC de 95%: 92,8, 96,5)		
Prevalência fora dos EUA		36,6% (IC de 95%: 31,7, 41,8)			Prevalência fora dos EUA:		36,6% (IC de 95%: 31,7, 41,8)		
VPP		91,6% (IC de 95%: 85,2, 95,4)			VPP		100% (IC de 95%: 94,8, 100)		
VPN		92,1% (IC de 95%: 87,9, 94,9)			VPN		79,4% (IC de 95%: 74,3, 83,8)		

Em sujeitos dos EUA, o VPN para dois resultados do Xpert MTB/RIF Assay foi de 98,5% (IC de 95%: 97,1%, 99,3%) enquanto que o VPN para dois resultados de esfregaços de BAR foi de 94,9% (IC de 95%: 92,8%, 96,5%) quando a prevalência de TB em sujeitos oriundos dos EUA foi de 14,4%.

A Tabela 17 apresenta informações detalhadas do desempenho do Xpert MTB/RIF Assay em comparação com esfregaços de BAR no que diz respeito ao tempo entre a colheita de amostras de expectoração em sujeitos oriundos dos EU.

Tabela 17. Desempenho do Xpert MTB/RIF Assay vs microscopia de esfregaço de BAR relativamente ao tempo de colheita entre amostras de expectoração

Resultados do Xpert	Resultados de esfregaço de BAR
Um resultado do Xpert Sensibilidade = 85,2% (75/88) Especificidade = 99,2% (526/530) Prevalência = 14,2% (88/618) VPN = 97,6% (526/539) Probabilidade de sujeitos com cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positiva entre resultados do Xpert MTB/RIF negativos = 0,4% (2/539)	Dados não analisados para um esfregaço de BAR
Dois resultados Xpert Sensibilidade = 91,2% (83/91) Especificidade = 98,9% (536/542) Prevalência = 14,4% (91/633) VPN = 98,5% (536/544) Probabilidade de sujeitos com cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre resultados negativos do Xpert MTB/RIF Assay = 0,0% (0/544)	Dois resultados de esfregaço de BAR Sensibilidade = 69,2% (63/91) Especificidade = 96,7% (524/542) Prevalência = 14,4% (91/633) VPN = 94,9% (524/552)

Tabela 17. Desempenho do Xpert MTB/RIF Assay vs microscopia de esfregaço de BAR relativamente ao tempo de colheita entre amostras de expectoração (Continuação)

Resultados do Xpert	Resultados de esfregaço de BAR
<p>Dois resultados do Xpert com duas amostras de expectoração colhidas com uma diferença ≥8 horas^a Sensibilidade = 92,5% (49/53) Especificidade = 98,9% (342/346) Prevalência = 13,3% (53/399) VPN = 98,9% (342/346)</p> <p>Probabilidade de sujeitos com cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre resultados negativos do Xpert MTB/RIF Assay = 0,0%</p>	<p>Dois resultados de esfregaço de BAR com duas amostras colhidas com uma diferença ≥8 horas^a Sensibilidade = 71,7% (38/53) Especificidade = 98,0% (339/346) Prevalência = 13,3% (53/399) VPN = 95,8% (339/354)</p>
<p>Dois resultados do Xpert com duas amostras colhidas com uma diferença <8 horas^b Sensibilidade = 89,5% (34/38) Especificidade = 99,0% (194/196) Prevalência = 16,2% (38/234) VPN = 98,0% (194/198)</p> <p>Probabilidade de pacientes com cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre resultados negativos do Xpert MTB/RIF Assay = 0,0%</p>	<p>Dois resultados de esfregaço de BAR com duas amostras colhidas com uma diferença <8 horas^b Sensibilidade = 65,8% (25/38) Especificidade = 99,4% (185/196) Prevalência = 16,2% (38/234) VPN = 93,4% (185/198)</p>
<p>Nenhum sujeito teve três amostras testadas pelo Xpert MTB/RIF Assay</p>	<p>Três resultados de esfregaço de BAR Sensibilidade = 60,4% (29/48) Especificidade = 96,6% (284/294) Prevalência = 14,0% (48/342) VPN = 93,7% (284/303)</p>
	<p>Três resultados de esfregaço de BAR com três amostras colhidas com uma diferença ≥8 horas^c Sensibilidade = 69,2% (9/13) Especificidade = 95,7% (112/117) Prevalência = 10,0% (13/130) VPN = 96,6% (112/116)</p>
	<p>Três resultados de esfregaço de BAR com três amostras colhidas com uma diferença <8 horas^d Sensibilidade = 57,1% (20/35) Especificidade = 97,2% (172/177) Prevalência = 16,5% (35/212) VPN = 92,0% (172/187)</p>

^a O prazo entre a colheita da primeira amostra de expectoração e da segunda amostra de expectoração é superior ou igual a 8 horas.

^b O prazo entre a colheita da primeira amostra de expectoração e da segunda amostra de expectoração é inferior a 8 horas.

^c O prazo entre a colheita da primeira amostra de expectoração e da segunda amostra de expectoração foi superior ou igual a 8 horas, e o prazo entre a colheita da segunda amostra de expectoração e da terceira amostra de expectoração foi superior ou igual a 8 horas.

^d Três esfregaços de BAR com menos de 8 horas significam que pelo menos um dos intervalos de tempo entre a colheita de amostras foi inferior a 8 horas.

A Tabela 13, a Tabela 14, a Tabela 15, a Tabela 16 e a Tabela 17 apresentam dados em que se combinam os resultados para expectoração em estado natural e sedimentos de expectoração concentrados. A Tabela 18 consiste num resumo do VPN exclusivamente para sujeitos oriundos dos EUA delineado por expectoração em estado natural e sedimentos de expectoração concentrados.

Tabela 18. Resumo do VPN para expectoração em estado natural e sedimentos de expectoração concentrados em sujeitos dos EUA^{a, b}

		Expectoração em estado natural (%) [IC 95%]	Sedimentos de Expectoração Concentrados (%) [IC 95%]
Um resultado do Xpert	Probabilidade de cultura do MTB positiva entre sujeitos com um resultado negativo no Xpert MTB/RIF	3,7% (9/242) [1,7%, 6,9%]	1,3% (4/297) [0,4%, 3,4%]
	Probabilidade de cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com um resultado negativo no Xpert MTB/RIF	0,8% (2/242) [0,1%, 3,0%]	0,0% (0/297) [0,0%, 1,2%]
Dois resultados Xpert	Probabilidade de cultura do MTB positiva entre sujeitos com resultados negativos no Xpert MTB/RIF	2,5% (6/239) [0,9%, 5,4%]	0,7% (2/283) [0,1%, 2,5%]
	Probabilidade de cultura do MTB positiva e esfregaço de BAR positivo entre sujeitos com resultados negativos no Xpert MTB/RIF	0,0% (0/239) [0,0%, 1,5%]	0,0% (0/283) [0,0%, 1,3%]

^a Valor Preditivo Negativo (VPN) = (1 – %Probabilidade)

^b Prevalência de cultura do MTB positiva entre sujeitos do estudo oriundos dos EUA = 14,3%

Nota

Para dois resultados do Xpert, a tabela acima inclui apenas pares de amostras em que a primeira e a segunda amostras eram do mesmo tipo. Para 239 amostras, o primeiro e o segundo testes foram para amostras de expectoração em estado natural; para 283 amostras, o primeiro e o segundo testes foram para sedimentos de expectoração concentrados; para 2 pares, a primeira amostra foi de expectoração em estado natural e a segunda de sedimento de expectoração concentrado (dados não incluídos na tabela acima, mas os pares de amostras apresentaram resultados 100% concordantes); finalmente, para 20 pares, a primeira amostra foi um sedimento de expectoração concentrado e o segundo expectoração em estado natural (dados não incluídos na tabela acima, mas os pares de amostras apresentaram resultados 100% concordantes).

14.3 Desempenho do Xpert MTB/RIF Assay na população com VIH

Para comparar o desempenho do Xpert MTB/RIF Assay em sujeitos infectados com VIH e sujeitos não infectados com VIH, os dados do Estudo 2 foram analisados através de estado do esfregaço de amostras e estado de VIH da população. A Tabela 19 e a Tabela 20 comparam as sensibilidades e as especificidades de um resultado do Xpert MTB/RIF Assay em amostras obtidas de sujeitos infectados com VIH e de sujeitos não infectados com VIH estratificados por resultados de esfregaço de BAR positivo e esfregaço de BAR negativo, respectivamente. Para sujeitos infectados com VIH e sujeitos não infectados com VIH, a sensibilidade do Xpert MTB/RIF Assay para detecção do complexo de MTB foi superior em amostras de esfregaço de BAR positivas (100,0% e 97,8%, respectivamente) do que em amostras de esfregaço de BAR negativas (52,1% e 58,3%, respectivamente). Estes dados são resumidos na Tabela 20.

Tabela 19. Comparação da sensibilidade e da especificidade do resultado de um Xpert MTB/RIF Assay em sujeitos infectados com VIH e sujeitos não infectados com VIH — apenas esfregaço de BAR positivo

Xpert MTB/RIF	Global	Infectados com VIH	Não infectados com VIH	Diferença (IC 95%)
Sensibilidade	98,5% (129/131)	100% (39/39)	97,8% (90/92)	2,2% (-0,8%, 5,2%)
Especificidade	94,4% (17/18)	100% (7/7)	90,9% (10/11)	9,1% (-7,9%, 26,1%)

Tabela 20. Comparação da sensibilidade e da especificidade do resultado de um Xpert MTB/RIF Assay em sujeitos infectados com VIH e sujeitos não infectados com VIH — apenas esfregaço de BAR negativo

Xpert MTB/RIF	Global	Infectados com VIH	Não infectados com VIH	Diferença (IC 95%)
Sensibilidade	54,8% (46/84)	52,1% (25/48)	58,3% (21/36)	-6,3% (-27,7%, 15,2%)
Especificidade	98,8% (718/721)	98,2% (332/338)	99,2% (386/389)	-1,0% (-2,7%, 0,7%)

15. Características de desempenho—Desempenho analítico

15.1 Reactividade analítica (Inclusividade)

A reactividade analítica do Xpert MTB/RIF Assay foi avaliada relativamente a 62 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* bem caracterizados representando diversidade geográfica e fenotípica. A Tabela 21 indica 26 estirpes sensíveis à rifampicina e 36 estirpes resistentes à rifampicina de acordo com o teste fenotípico de susceptibilidade a fármacos (DST).

Os resultados **MTB DETECTED (MTB DETECTADO); Rif Resistance NOT DETECTED (Resistência à Rif NÃO DETECTADA)** do Xpert MTB/RIF Assay comparativamente ao DST tiveram 87% (67/77) de exactidão em réplicas de teste válidas utilizando 26 estirpes sensíveis à rifampicina testadas em triplicado. Uma réplica em 78 testes não foi válida nem repetida. Foram registadas mutações resistentes à rifampicina em três das estirpes susceptíveis no DST (consulte a nota de rodapé “c” na Tabela 21) com resultado resistente à rifampicina pelo Xpert MTB/RIF Assay, de acordo com a análise à sequência de ADN. Uma das três réplicas da estirpe TDR 33 do tipo selvagem foi reportada como **MTB DETECTED; Rif Resistance INDETERMINATE (MTB DETECTADO, resistência à Rif INDETERMINADA)**. Os resultados **MTB DETECTED (MTB DETECTADO); Rif Resistance DETECTED (Resistência à Rif DETECTADA)** do Xpert MTB/RIF Assay comparativamente ao DST tiveram 100% (107/107) de exactidão em réplicas de teste válidas utilizando 36 estirpes resistentes à rifampicina testadas em triplicado. Uma réplica em 108 testes não foi válida nem repetida. A Tabela 21 apresenta os resultados por estirpe.

Tabela 21. Reactividade analítica (inclusividade) do Xpert MTB/RIF Assay

ID da estirpe	Origem	Susceptibilidade de segundo o DST ^a	Susceptibilidade de segundo o Xpert ^b
TDR 116	S. Coreia	R	R
TDR 21	República Democrática do Congo	R	R
TDR 28 ^c	Bangladeche	R	R
TDR 191 ^c	Peru	R	R
TDR 125	Brasil	R	R
TDR 34	Bangladeche	R	R
TDR 73	Peru	R	R
TDR 35	Bangladeche	R	R
TDR 190 ^c	Espanha	R	R
TDR 117	S. Coreia	R	R
TDR 129	Brasil	R	R
TDR 186 ^c	Marrocos	R	R
TDR 59 ^c	Burundi	R	R
TDR 185 ^c	Nigéria	R	R
TDR 6	Bangladeche	R	R

Tabela 21. Reactividade analítica (inclusividade) do Xpert MTB/RIF Assay (Continuação)

ID da estirpe	Origem	Susceptibilidade de segundo o DST ^a	Susceptibilidade de segundo o Xpert ^b
TDR 19	Azerbaijan	R	R
TDR 148	Nepal	R	R
TDR 13 ^c	Bangladeche	R	R
TDR 12	Bangladeche	R	R
H37Rv ^d	Estirpe de laboratório	S	S
TDR 22	República Democrática do Congo	S	S
TDR 29	Azerbaijan	S	S
TDR 33	Bélgica	S	S
CDC 1551 ^c	EUA	S	S
TDR 146 ^c	Nepal	S	S
TDR 78 ^c	S. Coreia	S	S
TDR 54 ^c	Bangladeche	S	S
TDR 215 ^c	Peru	S	S
TDR 158 ^c	Peru	S	S
TDR 178 ^c	Guiné	S	S
TDR 64 ^c	S. África	S	S
97-05193	Peru	R	R
97-05201	Peru	R	R
97-06877	Peru	R	R
97-08341	Peru	R	R
97-12004	Peru	R	R
97-17582	Peru	R	R
97-18875	Peru	R	R
97-20784	Peru	R	R
97-20985	Peru	R	R
99-09120	Peru	R	R
99-R396	Peru	R	R
01-R0612	Pequim	R	R
02-R1141	Pequim	R	R
02-R1794	Pequim	R	R
02-R1840	Pequim	R	R
03-R1517	Pequim	R	R
TDR 0116	S. Coreia	R	R
01-R1403 ^e	Peru	S	R
97-15246 ^e	Peru	S	R
98-R839 ^e	Peru	S	R

Tabela 21. Reactividade analítica (inclusividade) do Xpert MTB/RIF Assay (Continuação)

ID da estirpe	Origem	Susceptibilidade de segundo o DST ^a	Susceptibilidade de segundo o Xpert ^b
99-R460	Peru	S	S
99-R485	Peru	S	S
00-06461	EUA	S	S
00-R0222	Peru	S	S
00-R0454	EUA	S	S
00-R0460	Peru	S	S
01-10979	EUA	S	S
01-1118	Peru	S	S
02-02880	EUA	S	S
02-03222	Peru	S	S
02-R0040	Peru	S	S

^a R = resistente à RIF, S = susceptível à RIF

^b R = mutações resistentes à RIF detectadas, S = mutações resistentes à RIF não detectadas

^c O ADN foi utilizado; não se encontravam disponíveis estirpes cultivadas quantificadas.

^d A estirpe de referência H37Rv da ATCC foi testada sob a forma de células e ADN.

^e Isolado susceptível à rifampicina segundo o DST, mas resistente à rifampicina segundo a sequência de ADN e o Xpert MTB/RIF Assay.

Cinco estirpes adicionais do complexo *Mycobacterium tuberculosis* ou seja, *M. africanum* (taxid:33894), *M. bovis* (taxid:1765), *M. canettii* (taxid:78331), *M. caprae* (taxid:115862) e *M. microti* (taxid:1806) não foram testadas em meios húmidos, mas foram avaliadas *in silico* para determinar a reactividade analítica ou a inclusividade. Os resultados das análises *in silico* prevêm uma probabilidade muito elevada de amplificação e detecção utilizando o Xpert MTB/RIF Assay. Consultar a Tabela 22.

Tabela 22. Alinhamentos de iniciadores e sondas para as sequências *rpoB* do *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae* e *M. microti*

Organismo do complexo MTB	Alinhamento da sequência (número de resíduos idênticos) do iniciador/sonda Xpert MTB/RIF Assay para organismos do complexo MTB							
	RpoB For1	RpoB For2	RpoB Rev	Sonda A do RpoB ^a	Sonda B do RpoB ^a	Sonda C do RpoB ^a	Sonda D do RpoB ^a	Sonda E do RpoB ^a
<i>Mycobacterium africanum</i> (taxid:33894) ^b	24/24	24/24	23/24	17/17	24/24	17/17	18/18	18/18
<i>Mycobacterium bovis</i> (taxid:1765) ^b	24/24	24/24	23/24	17/17	24/24	17/17	18/18	18/18
<i>Mycobacterium canettii</i> (taxid:78331) ^b	24/24	24/24	23/24	17/17	24/24	17/17	18/18	18/18
<i>Mycobacterium caprae</i> (taxid:115862) ^b	24/24	24/24	23/24	17/17	24/24	17/17	18/18	18/18
<i>Mycobacterium microti</i> (taxid:1806) ^b	24/24	24/24	23/24	17/17	24/24	17/17	18/18	18/18

^a Alinhamento da sequência de sondas efectuado sem sequências principais.

^b taxid — identificador único para um organismo na base de dados de taxonomia do NCBI.

15.2 Especificidade analítica (exclusividade)

Foram testados cento e trinta e dois (132) microrganismos diferentes, representando agentes patogénicos respiratórios comuns potencialmente encontrados no tracto oral/respiratório numa concentração de pelo menos 10^8 UFC/ml (ou ADN a 1×10^7 cópias/ml) relativamente a bactérias e fungos; uma concentração de 10^5 TCID50/ml (ou ácido nucleico a 2×10^9 cópias/ml) para vírus; uma concentração de 10^6 corpos elementares (CE) por ml para clamídia e uma concentração de 10^6 UFC/ml para duas micobactérias não tuberculosas. Consultar a Tabela 23. A especificidade analítica do Xpert MTB/RIF Assay é de 100% numa concentração de 10^8 UFC/ml (ou ADN a 1×10^7 cópias/ml) para bactérias e fungos; uma concentração de 10^5 TCID50/ml (ou ácido nucleico a 2×10^9 cópias/ml) para vírus e uma concentração de 10^6 corpos elementares (CE) por ml para clamídia. A especificidade analítica do Xpert MTB/RIF Assay é de 100% numa concentração de 10^8 UFC/ml para 21 das 24 micobactérias não tuberculosas (NTM) testadas. Foi observada reactividade cruzada numa das três réplicas utilizando *M. scrofulaceum* a 10^8 UFC/ml; contudo, não foi observada reactividade cruzada a 10^7 UFC/ml. Dois NTM (*M. genavense* e *M. smegmatis*) não foram testados acima de 10^6 UFC/ml devido ao fraco crescimento. A especificidade analítica do Xpert MTB/RIF Assay é de 100% numa concentração de 10^6 UFC/ml para estes 2 organismos. Incluíram-se no estudo controlos positivos e negativos.

Tabela 23. Microrganismos testados para especificidade analítica

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Vírus da influenza humana B ^a	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Metapneumovírus humano	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Actinomyces israelii</i> ^b	Parainfluenza humana de tipo 1	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Parainfluenza humana de tipo 2	<i>Neisseria sicca</i>
Adenovírus	Parainfluenza humana de tipo 3	<i>Nocardia asteroides</i> ^b
<i>Aspergillus fumigatus</i> ^c	Vírus sincicial respiratório humano A ^a	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> ^b
<i>Bacillus cereus</i>	Vírus sincicial respiratório humano B ^a	<i>Pasteurella multocida</i> subespécie <i>tigris</i>
<i>Bacillus subtilis</i> subespécie <i>subtilis</i>	<i>Kingella kingae</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ^b
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bordetella parapertussis</i> ^b	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC-3 carbapenemase	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subespécie <i>pneumoniae</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> subespécie <i>jejuni</i> ^b	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Legionella pneumophila</i> subespécie <i>pneumophila</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subespécie <i>mesenteroides</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Rinovírus estirpe 1A
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Morganella morganii</i> subespécie <i>morganii</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> serovar <i>Dublin</i>
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> ^b	<i>Mycobacterium asiaticum</i>	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>avium</i>	<i>Serratia marcescens</i> subespécie <i>marcescens</i>

Tabela 23. Microrganismos testados para especificidade analítica (Continuação)

<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycobacterium celatum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ^b	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subespécie <i>aureus</i>
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subespécie <i>fortuitum</i>	<i>Staphylococcus capitis</i> subespécie <i>capitis</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Mycobacterium gastrii</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Mycobacterium genavense</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Cytomegalovirus	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> subespécie <i>hominis</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Enterobacter cloacae</i> subespécie <i>cloacae</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Mycobacterium malmoense</i>	<i>Streptococcus constellatus</i> subespécie <i>constellatus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Streptococcus equi</i> subespécie <i>equi</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
Enterovírus tipo 71/NY	<i>Mycobacterium simiae</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
<i>Escherichia coli</i> produtora de CTX-M-15 ESBL	<i>Mycobacterium szulgai</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subespécie <i>nucleatum</i>	<i>Mycobacterium terrae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subespécie <i>salivarius</i>
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	<i>Mycobacterium triviale</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Mycobacterium vaccae</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
Vírus herpes simplex tipo 1 ^a	<i>Mycobacterium xenopi</i>	<i>Veillonella parvula</i>
Vírus herpes simplex tipo 2 ^a	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ^b	<i>Weissella paramesenteroides</i>
Vírus influenza humana A ^a	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> subespécie <i>enterocolitica</i>

^a ADN genómico ou ARN utilizado; as concentrações testadas variaram entre $3,1 \times 10^9$ e $1,2 \times 10^{11}$ cópias/ml.

^b Utilizado ADN genómico; as concentrações testadas variaram entre 1×10^7 e 1×10^{10} cópias/ml.

^c Utilizado ADN genómico; concentração testada a $3,2 \times 10^8$ cópias/ml.

A reactividade cruzada potencial de 25 microrganismos que não puderam ser testados em meios húmidos utilizando organismos completos ou ácidos nucleicos foi avaliada através de análise *in silico*. Vinte dos 25 microrganismos testados não revelaram potencial para reactividade cruzada. Consulte a Tabela 24, a Tabela 25 e a Tabela 26.

Cinco isolados demonstraram um ligeiro potencial para reactividade cruzada que pode resultar em resultados falso-positivos com o Xpert MTB/RIF Assay. Consultar a Tabela 27.

Tabela 24. Microrganismos previstos como sem reactividade cruzada através de análise *in silico* (RpoB para sonda 1 + RpoB Rev)

Organismo	Acesso	Pontuação máx.	Query Cov	Valor E	Identidade
<i>Kingella oralis</i> Taxid:505	GU561427.1	16,4	69%	20	100%
<i>Legionella micdadei</i> Taxid:451	NR_041791.1	18,3	34%	3,6	100%
<i>Nocardia brasiliensis</i> Taxid:37326	JN215639.1	40,1	73%	0,000003	100%
<i>Streptomyces anulatus</i> Taxid:1892	AB431435.1	28,2	61%	0,026	100%
<i>Histoplasma capsulatum</i> Taxid:339724	XM_001536322.1	28,2	28%	1,5	100%
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>) Taxid:559298	XM_002624017.1	28,2	48%	1,5	100%
<i>Penicillium</i> spp. Taxid:500485	XM_002566094.1	30,2	38%	2	95%
<i>Rhizopus</i> spp. Taxid:4847	AY847625.1	22,3	28%	8,1	93%
<i>Scedosporium</i> spp. Taxid:563467	HQ231813.1	18,3	57%	23	100%
Vírus da rubéola Taxid:111041	AB588191.1	24,3	97%	2,4	100%
Vírus da rubéola Taxid:884098	JN635408.1	22,3	22%	36	100%
Rubulavírus Taxid:11161	EU606317.1	22,3	22%	13	100%
Vírus Varicella Zoster Taxid:10335	JQ972914.1	22,3	89%	45	100%
<i>Mycobacterium franklinii</i> Taxid:948102	HQ662080.1	22,3	83%	0,36	100%
<i>M. massiliense</i> , <i>M. bolletii</i> , <i>M. abscessus</i> subespécie <i>bolletii</i> Taxid:319705	NC_018150.2	32,2	100%	0,21	95%

Tabela 24. Microrganismos previstos como sem reactividade cruzada através de análise *in silico* (RpoB para sonda 1 + RpoB Rev) (Continuação)

Organismo	Acesso	Pontuação máx.	Query Cov	Valor E	Identidade
<i>Mycobacterium chimaera</i> Taxid:222805	AY943187.1	26,3	83%	0,016	90%
<i>Mycobacterium avium</i> subspécie <i>paratuberculosis</i> Taxid:1770	AF057479.1	36,2	85%	0,005	100%
<i>Mycobacterium avium</i> subspécie <i>silvaticum</i> Taxid:44282	AY544889.1	28,2	85%	0,004	94%
<i>Mycobacterium avium</i> subspécie <i>hominissuis</i> Taxid:439334	AP012555.1	30,2	100%	0,15	100%
<i>Mycobacterium immunogenum</i> Taxid:83262	HM454251.1	32,2	48%	5E-04	95%

Tabela 25. Microrganismos previstos como sem reactividade cruzada através de análise *in silico* (RpoB para sonda 2 + RpoB Rev)

Organismo	Acesso	Pontuação máx.	Query Cov	Valor E	Identidade
<i>Kingella oralis</i> Taxid:505	GU561427.1	14,4	57%	79	100%
<i>Legionella micdadei</i> Taxid:451	X57520.1	18,3	55%	3,6	100%
<i>Nocardia brasiliensis</i> Taxid:37326	DQ085110.1	38,2	46%	0,00001	100%
<i>Streptomyces anulatus</i> Taxid:1892	AB431435.1	28,2	71%	0,026	100%
<i>Histoplasma capsulatum</i> Taxid:339724	XM_001536322.1	28,2	28%	1,5	100%
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>) Taxid:559298	XM_002625196.1	30,2	30%	0,38	100%
<i>Penicillium</i> spp. Taxid:500485	XM_002565312.1	30,2	44%	2	91%
<i>Rhizopus</i> spp. Taxid:4847	HM130700.1	20,3	73%	32	100%

Tabela 25. Microrganismos previstos como sem reactividade cruzada através de análise *in silico* (RpoB para sonda 2 + RpoB Rev) (Continuação)

Organismo	Acesso	Pontuação máx.	Query Cov	Valor E	Identidade
<i>Scedosporium</i> spp. Taxid:563467	AY625497.1	20,3	44%	5,7	100%
Vírus da rubéola Taxid:111041	AB588191.1	24,3	81%	2,4	100%
Vírus da rubéola Taxid:884098	JN635410.1	24,3	38%	9,1	100%
Rubulavirus Taxid:11161	BK005918.1	24,3	85%	3,2	100%
Vírus Varicella Zoster Taxid:10335	JQ972914.1	20,3	91%	1,77	100%
<i>Mycobacterium franklinii</i> Taxid:948102	HQ662038.1	22,3	83%	0,36	100%
<i>M. massiliense</i> , <i>M. bolletii</i> , <i>M. abscessus</i> subspécie <i>bolletii</i> Taxid:319705	NC_018150.2	32,2	100%	0,21	100%
<i>Mycobacterium chimaera</i> Taxid:222805	AY943187.1	40,1	91%	1E-06	96%
<i>Mycobacterium avium</i> subspécie <i>paratuberculosis</i> Taxid:1770	AF057479.1	36,2	59%	0,005	100%
<i>Mycobacterium avium</i> subspécie <i>silvaticum</i> Taxid:44282	AY544889.1	28,2	79%	0,004	94%
<i>Mycobacterium avium</i> subspécie <i>hominissuis</i> Taxid:439334	AP012555.1	32,2	100%	0,38	100%
<i>Mycobacterium immunogenum</i> Taxid:83262	HQ662101.1	24,3	36%	0,13	100%

Tabela 26. Microrganismos previstos como sem reactividade cruzada através de análise *in silico* (todas as pipetas RpoB sem sequências principais)

Organismo	Acesso	Pontuação máx.	Query Cov	Valor E	Identidade
<i>Kingella oralis</i> Taxid:505	0	0	0%		0
<i>Legionella micdadei</i> Taxid:451	AF367743.1	33,7	72%	0,0001	72%
<i>Nocardia brasiliensis</i> Taxid:37326	DQ085110.1	77	100%	4E-17	81%
<i>Streptomyces anulatus</i> Taxid:1892	U64692.1	26,5	27%	0,14	86%
<i>Histoplasma capsulatum</i> Taxid:339724	XM_001538897.1	30,1	27%	0,63	91%
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>) Taxid:559298	XM_002623914.1	28,3	18%	2,3	100%
<i>Penicillium</i> spp. Taxid:500485	XM_002557696.1	30,1	20%	3,5	100%
<i>Rhizopus</i> spp. Taxid:4847	AY147870.1	22,9	15%	8,8	0
<i>Scedosporium</i> spp. Taxid:563467	0	0	0%		0
Vírus da rubéola Taxid:111041	0	0	0%		0
Vírus da rubéola Taxid:884098	0	0	0%		0
Rubulavirus Taxid:11161	0	0	0%		0
Vírus Varicella Zoster Taxid:10335	0	0	0%		0
<i>Mycobacterium franklinii</i> Taxid:948102	HQ662092.1	24,3	88%	0,16	100%
<i>M. massiliense</i> , <i>M. bolletii</i> , <i>M. abscessus</i> subespécie <i>bolletii</i> Taxid:319705	DQ987717.1	75,8	75%	3E-14	92%
<i>Mycobacterium chimaera</i> Taxid:222805	AY943187.1	91,7	100%	6E-22	90%

Tabela 26. Microrganismos previstos como sem reactividade cruzada através de análise *in silico* (todas as pipetas RpoB sem sequências principais) (Continuação)

Organismo	Acesso	Pontuação máx.	Query Cov	Valor E	Identidade
<i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i> Taxid:1770	CP005928.1	83,8	100%	4E-17	89%
<i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>silvaticum</i> Taxid:44282	AY544889.1	107	100%	8E-27	90%
<i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>hominissuis</i> Taxid:439334	AP012555.1	107	100%	1E-24	90%
<i>Mycobacterium immunogenum</i> Taxid:83262	HM454251.1	95,1	97%	1E-22	87%

Tabela 27. Microrganismos que se prevê terem potencialmente reactividade cruzada através da análise *in silico*

<i>Mycobacterium kumamontonense</i>
<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Tsukamurella spp.</i>
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>

15.3 Sensibilidade analítica (Limite de detecção)

Foram realizados estudos para determinar o limite de detecção (LoD) de isolados humanos de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* BCG (Bacille Calmette-Guerin) diluídos em expectoração humana e sedimento de expectoração humana. O LoD é a concentração mais baixa reportada em UFC/ml que pode ser distinguida de forma reprodutível a partir de amostras negativas com 95% de confiança. Foram avaliadas réplicas de 20 em concentrações de cinco a oito, tendo o limite de detecção sido determinado recorrendo à análise Probit, à excepção do teste realizado com células TDR125 da estirpe mutante resistente à rifampicina do *M. tuberculosis* em sedimento de expectoração, o qual foi realizado a apenas uma concentração, em réplicas de 40. Consultar a Tabela 28.

Tabela 28. Dados da análise Probit e limite de detecção obtido em UFC/ml

Microrganismo (estirpe)	Tipo de amostra	Estimativa do LoD	LoD obtido
<i>M. bovis</i> (BCG)	Expectoração	486	525
	Sedimento de expectoração	703	700
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	Expectoração	414	600
	Sedimento de expectoração	2046	3000
<i>M. tuberculosis</i> (TDR125)	Expectoração	872	1000
	Sedimento de expectoração	ND ^a	4000

^a Não determinado (ND) através de análise Probit.

15.4 Estudo de substâncias que interferem

O desempenho do Xpert MTB/RIF Assay foi avaliado na presença de 32 substâncias potencialmente interferentes. As substâncias endógenas potencialmente interferentes podem incluir, entre outras, sangue, pus (leucócitos), células do tracto respiratório, mucina, ADN humano e ácido gástrico proveniente do estômago. Outras substâncias potencialmente interferentes incluem anestésicos, antibióticos, anti-bacterianos, fármacos anti-tuberculose, fármacos anti-virais, broncodilatadores, broncodilatadores inalados, vacina intranasal viva do vírus influenza, elixir bucal germicida, reagentes de processamento de amostras, medicação para *Pneumocystis jiroveci*, analgésicos homeopáticos para as alergias, corticosteróides nasais, geles nasais, sprays nasais, anestésicos orais, expectorantes orais, tampões neutralizantes e tabaco. Estas substâncias estão discriminadas na Tabela 29, com indicação dos ingredientes activos e concentrações testadas. Incluíram-se no estudo amostras positivas e negativas. As amostras positivas foram testadas perto do limite de detecção analítico utilizando uma estirpe H37Rv susceptível à rifampicina inactiva e uma estirpe TDR6 resistente à rifampicina inactiva (mutante da sonda E). Ambas as estirpes foram testadas em réplicas de 8. As amostras negativas, compostas pela substância ausente da estirpe do MTB, foram testadas por substância em réplicas de 8 para determinar o efeito no desempenho do controlo de processamento da amostra (SPC). Foi observada inibição do Xpert MTB/RIF Assay na presença de lidocaína a 30%, mucina a 5% e 2,5%, etambutol a 50 µg/ml, 25 µg/ml e 10 µg/ml, guaifenesina a 5 mg/ml, fenilefrina a 100% e 50% e óleo da árvore do chá a 0,5% até 0,015% resultando num resultado falso-negativo **MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO)** ou num resultado **Rif Resistance INDETERMINATE (Resistência à Rif INDETERMINADA)**.

Tabela 29. Substâncias potencialmente interferentes no Xpert MTB/RIF Assay

Substância	Descrição/princípio activo	Concentração testada
Sangue (humano)		5% (v/v)
Elixir bucal germicida	Gluconato de clorexidina (0,12%), solução a 20%	20% (v/v)
Reagentes de processamento de amostras	Cloreto de cetilpiridínio, 1% em NaCl a 2%	0,5% (v/v) em NaCl a 1%
Reagentes de processamento de amostras	Cloreto de cetilpiridínio, 1% em NALC a 2%	0,5% (v/v) em 1% NALC
Reagentes de processamento de amostras	Cloreto de cetilpiridínio, 1% em 2% NALC mais 25 mM citrato	0,5% (v/v) em 1% NALC plus 12,5 mM Citrato
Ácido gástrico	Solução de pH 3 a 4 em água, neutralizada com bicarbonato de sódio	100% (v/v)
ADN/células humanas	HELA 229	10 ⁶ células/ml
Antimicótico; Antibiótico	Suspensão oral de nistatina, 20%	20% (v/v)
Leucócitos (humanos)	Matriz de leucócitos/pus (camada leucocitária de 30%, plasma de 30%, PBS de 40%)	100% (v/v)
Anestésicos (entubação endotraqueal)	Cloridrato de lidocaína a 4%	20% a 30% (v/v)
Soluções nebulizantes	NaCl a 5% (p/v)	5% (p/v)
Mucina	Mucina a 5% (p/v)	1,5% a 5% (p/v)
Antibacteriano, sistémico	Levofloxacina a 25 mg/ml	5 mg/ml
Corticosteróides nasais	Fluticasona a 500 mcg/spray	5 µg/ml
Broncodilatadores inalados	Sulfato de albuterol a 2,5 mg/3 ml	50 µg/ml; 100 µg/ml
Anestésicos orais	Orajel (benzocaína a 20%)	5% (p/v)
Fármacos anti-virais	Aciclovir, IV 50 mg/ml	50 µg/ml
Antibiótico, pomada nasal	Neosporin (400 U bacitracina, 3,5 mg neomicina, 5000 U polimixina B)	5% (p/v)
Tabaco	Nicogel (extracto de tabaco a 40%)	0.5% (p/v)

Tabela 29. Substâncias potencialmente interferentes no Xpert MTB/RIF Assay (Continuação)

Substância	Descrição/princípio activo	Concentração testada
Fármacos anti-tuberculose	Estreptomicina 1 mg/ml	25 µg/ml
Fármacos anti-tuberculose	Etambutol 1 mg/ml	5 µg/ml a 50 µg/ml
Fármacos anti-tuberculose	Isoniazida 1 mg/ml	50 µg/ml
Expectorantes orais	Guaifenesina (400 mg/comprimido)	2,5 mg/ml; 5 mg/ml
Fármacos anti-tuberculose	Pirazinamida 10 mg/ml	100 µg/ml
Gel nasal (homeopático)	Gel Zicam	50% (p/v)
Spray nasal	Fenilefrina 0,5%	25% a 100% (v/v)
Fármacos anti-tuberculose	Rifampicina 1 mg/ml	25 µg/ml
Analgésico para a alergia (homeopático)	Óleo da árvore do chá (< 5% Cineol, > 35% Terpineno-4-01)	0,008% a 0,5% (v/v)
Vacina intranasal viva do vírus influenza	Vacina viva do vírus influenza	5% (v/v)
Medicação para <i>Pneumocystis jiroveci</i>	Pentamidina	300 ng/ml
Broncodilatador	Epinefrina (fórmula injectável)	1 mg/ml
Tampão neutralizante	Tampão neutralizante XPR- <i>plus</i> ™	Fosfato > 67mM

15.5 Estudo de contaminação cruzada (carry-over)

Foi realizado um estudo para demonstrar que o “carry-over” e a contaminação cruzada potencial não ocorrem quando são utilizados cartuchos do Xpert MTB/RIF Assay de utilização única e autónomos. O estudo consistiu numa amostra negativa processada no mesmo módulo GeneXpert imediatamente após uma amostra positiva muito elevada contendo *M. bovis* BCG a uma concentração de aproximadamente 1×10^6 UFC/ml aditivada num tampão TET. Este esquema de teste foi repetido 20 vezes em dois módulos GeneXpert, para um total de 42 execuções, resultando em 20 amostras positivas e 22 negativas. A totalidade das 20 amostras positivas foi correctamente reportada como **MTB DETECTED; Rif Resistance NOT DETECTED (MTB DETECTADO, resistência à Rif NÃO DETECTADA)**, e a totalidade das 22 amostras negativas foi correctamente reportada como **MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO)**.

15.6 Estudo de resistência à RIF

Devido à baixa prevalência de resistência à RIF, foi realizado um estudo adicional não-clínico para avaliar o desempenho do Xpert MTB/RIF Assay para a detecção de mutações genéticas associadas à resistência à RIF em isolados clínicos susceptíveis e resistentes à RIF bem caracterizados adicionados a um grupo de expectoração do MTB negativo conhecido. Cinquenta alíquotas negativas de expectoração humana com MTB negativo agrupadas foram misturadas de forma aleatória para serem testadas entre as positivas. A sensibilidade e especificidade do Xpert MTB/RIF Assay para a detecção de mutações associadas à resistência à RIF, relativamente ao teste de sensibilidade a fármacos utilizando métodos de proporção em ágar Middlebrook foram de 97,7% (85/87) com um IC de 95%: 92,0%–99,4% e 90,8% (89/98) com IC de 95%: 83,5%–95,1%, respectivamente.

Das 11 amostras com resultados de RIF discordantes, o sequenciamento bidireccional foi concordante com o Xpert MTB/RIF Assay para 10 das 11 amostras e discordante com 1 das 11 amostras.

16. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do Xpert MTB/RIF Assay foi avaliada em três locais utilizando amostras compostas por estirpes cultivadas de *M. tuberculosis* aditivadas num grupo de expectoração humana com MTB negativo. As amostras foram preparadas a níveis de concentração representando positivos baixos (~1X LoD) e positivos moderados (2-3X LoD) tanto para as estirpes susceptíveis como resistentes à RIF. Os membros negativos do painel foram também incluídos e eram compostos por expectoração humana com MTB negativo agrupado. Foi testado um painel de cinco amostras em cinco dias diferentes por dois operadores diferentes três vezes por dia em três locais (30 testes em cada local = 2 operadores x 5 dias x 3 réplicas por dia). Foi utilizado no estudo um lote de kit de reagentes do Xpert MTB/RIF Assay. A concordância percentual para cada membro do painel é apresentada por local na Tabela 30.

Tabela 30. Resumo dos resultados de reprodutibilidade — Concordância por local/instrumento do estudo

Preparação	Local 1 (Infinity-80)	Local 2 (GeneXpert Dx)	Local 3 (Infinity-48)	% de concordância total por amostra
Resistente à MTB/RIF 2-3X LoD	100,0% (30/30)	100,0% (30/30)	100,0% (30/30)	100,0% (90/90)
Resistente à MTB/RIF 1X LoD	93,3% (28/30)	96,7% (29/30)	96,7% (29/30)	95,6% (86/90)
Sensível à MTB/RIF 2-3X LoD	100,0% (30/30)	100,0% (30/30)	100,0% (30/30)	100,0% (90/90)
Sensível à MTB/RIF 1X LoD	96,7% (29/30)	100,0% (30/30)	100,0% (30/30)	98,9% (89/90)
Negativo	100,0% (30/30)	100,0% (29/29)	100,0% (30/30)	100,0% (89/89) ^a

^a Uma amostra foi não determinada após o teste inicial nem após a repetição do teste.

A reprodutibilidade do ensaio Xpert MTB/RIF Assay também foi avaliada em termos do sinal de fluorescência expresso em valores de limiar de ciclo (Ct) para cada alvo detectado. A média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) entre locais, entre dias, entre operadores e nos componentes do processamento para cada membro do painel são apresentados na Tabela 31. Um processamento é definido como as três amostras por membro do painel testadas por um operador, num local e num dia.

Tabela 31. Resumo dos dados de reprodutibilidade^a

Sonda	Alvo		Concordância/número total (%)	Ct médio	Entre locais		Entre dias		Entre operadores		No processamento		Total	
	MTB/RIF	Conc (LoD)			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
A	POS/R	2-3X	90/90 (100)	26,23	0,19	0,7	0,09	0,4	0,00	0,0	1,36	5,2	1,37	5,2
	POS/R	1X	86/90 (95,6)	27,13	0,00	0,0	0,78	2,9	0,00	0,0	1,74	6,4	1,91	7,0
	POS/S	2-3X	90/90 (100)	25,89	0,00	0,0	0,38	1,5	0,00	0,0	1,43	5,5	1,48	5,7
	POS/S	1X	89/90 (89,9)	27,25	0,00	0,0	0,00	0,0	0,36	1,3	1,28	4,7	1,33	4,9
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	89/89 (100)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
B	POS/R	2-3X	90/90 (100)	38,41	0,26	0,7	0,72	1,9	0,00	0,0	1,59	4,1	1,76	4,6
	POS/R	1X	86/90 (95,6)	38,47	0,00	0,0	0,82	2,1	0,16	0,4	1,68	4,4	1,88	4,9
	POS/S	2-3X	90/90 (100)	27,01	0,00	0,0	0,33	1,2	0,00	0,0	1,42	5,3	1,46	5,4
	POS/S	1X	89/90 (89,9)	28,21	0,03	0,1	0,00	0,0	0,34	1,2	1,25	4,4	1,29	4,6
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	89/89 (100)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
C	POS/R	2-3X	90/90 (100)	26,52	0,21	0,8	0,00	0,0	0,00	0,0	1,30	4,9	1,31	4,9
	POS/R	1X	86/90 (95,6)	27,37	0,00	0,0	0,79	2,9	0,00	0,0	1,66	6,1	1,84	6,7
	POS/S	2-3X	90/90 (100)	26,13	0,00	0,0	0,36	1,4	0,00	0,0	1,44	5,5	1,49	5,7
	POS/S	1X	89/90 (89,9)	27,44	0,00	0,0	0,00	0,0	0,35	1,3	1,25	4,6	1,30	4,7
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	89/89 (100)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
D	POS/R	2-3X	90/90 (100)	27,65	0,18	0,6	0,00	0,0	0,00	0,0	1,33	4,8	1,35	4,9
	POS/R	1X	86/90 (95,6)	28,51	0,00	0,0	0,81	2,9	0,00	0,0	1,63	5,7	1,82	6,4
	POS/S	2-3X	90/90 (100)	27,35	0,00	0,0	0,36	1,3	0,00	0,0	1,36	5,0	1,41	5,2
	POS/S	1X	89/90 (89,9)	28,62	0,00	0,0	0,00	0,0	0,26	0,9	1,16	4,1	1,19	4,2
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	89/89 (100)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
E	POS/R	2-3X	90/90 (100)	27,77	0,27	1,0	0,13	0,5	0,00	0,0	1,50	5,4	1,53	5,5
	POS/R	1X	86/90 (95,6)	28,72	0,22	0,8	0,79	2,8	0,00	0,0	1,84	6,4	2,01	7,0
	POS/S	2-3X	90/90 (100)	27,47	0,23	0,8	0,34	1,2	0,00	0,0	1,52	5,5	1,57	5,7
	POS/S	1X	89/90 (89,9)	28,86	0,00	0,0	0,00	0,0	0,51	1,8	1,37	4,8	1,46	5,1
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	89/89 (100)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

^a Conc = concentração, Ct = limiar de ciclo, CV = coeficiente de variação, LoD = limite de detecção, N = número, N/A = Não aplicável para amostras negativas, DP = desvio padrão; R = resistente à RIF; S = susceptível à RIF

17. Precisão do sistema do instrumento

Foi realizado um estudo de precisão interno para comparar o desempenho do GeneXpert Dx e o sistema de instrumentos Infinity-80 utilizando as amostras compostas por estirpes cultivadas de *M. tuberculosis* adicionadas num grupo de expectoração humana MTB negativo. As amostras foram preparadas a níveis de concentração representando positivos baixos (~1X LoD) e positivos moderados (2-3X LoD) tanto para as estirpes susceptíveis como resistentes à RIF. Foram também incluídos membros do painel negativos, compostos por expectoração humana MTB negativo. Foi testado um painel de cinco amostras em 12 dias diferentes por dois operadores. Cada operador realizou quatro execuções de cada painel de amostra por dia em cada um dos dois sistemas de instrumentos (96 testes em cada instrumento = 4 testes x 12 dias x 2 operadores). Foi utilizado no estudo um lote do kit de reagentes do Xpert MTB/RIF Assay. A concordância percentual para cada membro do painel é apresentada por instrumento na Tabela 32.

Tabela 32. Resumo dos resultados de precisão do instrumento; concordância percentual

Preparação	GeneXpert Dx	Infinity-80	% de concordância total por amostra
Resistente à MTB/RIF 2-3X LoD	100,0% (94/94)	99,0% (95/96)	99,5% (189/190) ^{a,b}
Resistente à MTB/RIF 1X LoD	97,9% (94/96)	99,0% (95/96)	98,4% (189/192) ^c
Sensível à MTB/RIF 2-3X LoD	100,0% (96/96)	100,0% (96/96)	100,0% (192/192)
Sensível à MTB/RIF 1X LoD	91,6% (87/95)	86,5% (83/96)	89,0% (170/191) ^{a,d}
Negativo	99,0% (95/96)	97,9% (94/96)	98,4% (189/192) ^e

^a Foram não determinadas pelo Xpert MTB/RIF Assay 2 amostras positivas moderadas resistentes à MTB/RIF e 1 amostra positiva baixa sensível à MTB/RIF no teste inicial e na repetição do teste.

^b 1 amostra **MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO)**.

^c 2 amostras **MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO)** e 1 amostra **MTB DETECTED (MTB DETECTADO)**; Rif Resistance **INDETERMINATE (Resistência à Rif INDETERMINADA)**.

^d 17 amostras **MTB NOT DETECTED (MTB NÃO DETECTADO)** e 4 amostras **MTB DETECTED (MTB DETECTADO)**; Rif Resistance **INDETERMINATE (Resistência à Rif INDETERMINADA)**.

^e 3 amostras **MTB DETECTED (MTB detectado)**; Rif Resistance **NOT DETECTED (Resistência à Rif NÃO DETECTADA)**.

A precisão do Xpert MTB/RIF Assay também foi avaliada em termos do sinal de fluorescência expresso em valores de Ct para cada alvo detectado. A média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) entre instrumentos, entre dias, entre operadores e nos componentes do processamento para cada membro do painel são apresentados na Tabela 33. Um processamento é definido como quatro amostras por membro do painel testadas por um operador, num instrumento e num dia.

Tabela 33. Resumo dos dados de precisão do instrumento^a

Sonda	Alvo		Concordância/número total (%)	Ct médio	Entre instrumentos		Entre dias		Entre operadores		No processamento		Total	
	MTB/RIF	Conc (LoD)			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
A	POS/R	2-3X	189/190 (99,5)	25,52	0,00	0,0	0,62	2,4	0,00	0,0	1,23	4,8	1,37	5,4
	POS/R	1X	189/192 (98,4)	27,03	0,00	0,0	0,00	0,0	0,59	2,2	1,36	5,0	1,48	5,5
	POS/S	2-3X	192/192 (100)	25,43	0,23	0,9	0,41	1,6	0,00	0,0	1,28	5,0	1,36	5,4
	POS/S	1X	170/191 (89,0)	27,44	0,00	0,0	1,24	4,5	1,16	4,2	1,79	6,5	2,46	9,0
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	189/192 (98,4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
B	POS/R	2-3X	189/190 (99,5)	37,45	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	2,00	5,3	2,00	5,3
	POS/R	1X	189/192 (98,4)	38,06	0,00	0,0	0,00	0,0	0,66	1,7	1,76	4,6	1,88	4,9
	POS/S	2-3X	192/192 (100)	26,44	0,30	1,1	0,25	0,9	0,00	0,0	1,31	5,0	1,37	5,2
	POS/S	1X	170/191 (89,0)	28,16	0,00	0,0	0,96	3,4	1,01	3,6	1,79	6,4	2,26	8,0
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	189/192 (98,4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
C	POS/R	2-3X	189/190 (99,5)	25,77	0,00	0,0	0,62	2,4	0,00	0,0	1,19	4,6	1,34	5,2
	POS/R	1X	189/192 (98,4)	27,27	0,00	0,0	0,00	0,0	0,54	2,0	1,32	4,8	1,42	5,2
	POS/S	2-3X	192/192 (100)	25,63	0,23	0,9	0,36	1,4	0,00	0,0	1,29	5,0	1,36	5,3
	POS/S	1X	170/191 (89,0)	27,62	0,00	0,0	1,01	3,6	1,09	4,0	2,06	7,4	2,54	9,2
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	189/192 (98,4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
D	POS/R	2-3X	189/190 (99,5)	27,00	0,00	0,0	0,57	2,1	0,00	0,0	1,17	4,3	1,30	4,8
	POS/R	1X	189/192 (98,4)	28,44	0,10	0,3	0,00	0,0	0,53	1,9	1,31	4,6	1,42	5,0
	POS/S	2-3X	192/192 (100)	26,98	0,24	0,9	0,34	1,3	0,00	0,0	1,26	4,7	1,33	4,9
	POS/S	1X	170/191 (89,0)	28,79	0,00	0,0	1,22	4,2	1,11	3,8	1,64	5,7	2,33	8,1
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	189/192 (98,4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
E	POS/R	2-3X	189/190 (99,5)	28,84	0,00	0,0	0,61	2,3	0,00	0,0	1,20	4,5	1,35	5,0
	POS/R	1X	189/192 (98,4)	28,44	0,00	0,0	0,00	0,0	0,63	2,2	1,38	4,8	1,52	5,3
	POS/S	2-3X	192/192 (100)	26,89	0,18	0,7	0,42	1,6	0,00	0,0	1,31	4,9	1,39	5,2
	POS/S	1X	170/191 (89,0)	28,86	0,00	0,0	1,41	4,9	0,81	2,8	1,74	6,0	2,38	8,2
	NEG (Negativo)	NEG (Negativo)	189/192 (98,4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

^a Conc=concentração, Ct=limiar do ciclo, CV=coeficiente de variação, LoD= limite de detecção, N=número.
N/A – Não aplicável a amostras negativas, SD = Desvio padrão; R=Resistente à RIF; S=Susceptível à RIF

18. Referências

1. WHO report 2008. Tuberculosis (TB). http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html
2. WHO report 2011. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
3. Center for Disease Control and Prevention. Trends in Tuberculosis, 2012. <http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/statistics/Trends.pdf>.
4. Hoyert DL, Xu J. Deaths: Preliminary data for 2011. National Vital Statistics Reports. 2012;61(6):p. 16.
5. Reported Tuberculosis in the United States, 2011. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, October 2012.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, 2005. MMWR 2005;54(No. RR-17).
7. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
9. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. 2009. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition HHS Publication No. (CDC) 21-1112. Available from: <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bml5/BMBL.pdf>. Accessed December 14, 2012.
10. Kent, PT, Kubica, GP, 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Public Health and Human Services, Atlanta, GA.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Summary of Notifiable Diseases. MMWR. <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm6153.pdf>
12. Council to Improve Foodborne Outbreak Response. Analysis of State Legal Authorities. <http://www.cifor.us/documents/CIFORAnalysisStateLegalAuthorities.pdf>.

19. Locais das sedes da Cepheid

Sede corporativa

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
Estados Unidos da América
Telefone: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Sede europeia

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
França
Telefone: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

20. Assistência Técnica

Antes de contactar a Assistência Técnica da Cepheid, reúna as seguintes informações:

- Nome do produto
- Número de lote
- Número de série do instrumento
- Mensagens de erro (se houver alguma)
- Versão de software e, caso se aplique, número de Service Tag (etiqueta de serviço) do Computador















Informações de contacto

Estados Unidos da América
Telefone: + 1 888 838 3222
E-mail: techsupport@cepheid.com

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

As informações de contacto para outros escritórios da assistência técnica da Cepheid estão disponíveis no nosso website: www.cepheid.com/en/CustomerSupport.

21. Tabela de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Não reutilizar
	Código do lote
	Consulte as instruções de utilização
	Cuidado
	Fabricante
	País de fabrico
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Controlo
	Prazo de validade
	Limites de temperatura
	Riscos biológicos
	Líquido e vapor inflamáveis
	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves



Cepheid
 904 Caribbean Drive
 Sunnyvale, CA 94089-1189
 EUA

Telefone: + 1 408 541 4191
 Fax: + 1 408 541 4192

