

NOTICE of CHANGE dated 01/09/2025

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«MDR/MTB ELITe MGB Kit»

Ref. RTS120ING

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following change:

- *Additional testing on negative sputum samples*
- *Verification of effectiveness in detecting new mutations identified in the *rpoB* and *katG* genes, associated respectively with resistance to Rifampicin and Isoniazid, in *Mycobacterium tuberculosis* samples.*
- *The messages for the results of the MTB complex detection and the analysis of MTB antibiotic resistance were aligned to the outputs of the current version of the assay protocol.*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Turin ITALY

Escritórios: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936

76 11

E-mail: emd.support@elitechgroup.com

MDR/MTB ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS120ING



IVD



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 2
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 3
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 4
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 5
PROCEDIMENTO	página 7
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 15
REFERÊNCIAS	página 28
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 28
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 29
SÍMBOLOS	página 30
NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES	página 31
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 31

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O «MDR/MTB ELITE MGB® Kit» faz parte de um ensaio de amplificação de ácidos nucleicos qualitativo que se destina a detetar ADN do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*) e a identificar as principais mutações associadas à resistência à rifampicina e/ou à isoniazida.

O ensaio tem de ser realizado com o sistema **ELITE InGenius®**, começando por amostras de saliva, aspirados gástricos (BA), lavagens broncoalveolares (BAL), urina, fluidos de cavidades, biopsias e aspirados gástricos previamente liquefeitos, descontaminados e desativados.

O produto pode ser usado para dois fins diferentes:

- como um auxílio no diagnóstico de tuberculose do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em associação com os dados clínicos do paciente e outros resultados de testes laboratoriais, em particular os métodos de cultura para micobactérias,
- como um auxílio no diagnóstico de tuberculose e resistência genotípica do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em associação com os dados clínicos do paciente e outros resultados de testes laboratoriais, em particular o teste fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real multiplexada realizada com o **ELITe InGenius**, um sistema automático integrado para a extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados.

Para o fim exclusivo da detecção de tuberculose e identificação da resistência genotípica do complexo MTB, a começar pelo ADN extraído de cada amostra na análise, na mesma sessão analítica, foram levadas a cabo duas reações de amplificação usando a TB1 PCR Mix e a TB2 PCR Mix em duas PCR Cassettes.

O tubo de teste da **TB1 PCR Mix** amplifica os seguintes alvos:

- uma região da sequência repetida IS6110, detetada por uma sonda específica (Canal MTB), para identificar o complexo MTB,
- a região de ponto quente bp 81 do gene *rpoB*, detetada por três sondas específicas (Canais *rpoB2*, *rpoB3*, *rpoB4*), para identificar a resistência genotípica à rifampicina.

O tubo de teste da **TB2 PCR Mix** amplifica os seguintes alvos:

- a região de ponto quente bp 81 do gene *rpoB*, detetada por uma sonda específica (canal *rpoB1*), para identificar a resistência genotípica à rifampicina,
- a região do codão 315 do gene *rpoB*, detetada por uma sonda específica (canal *rpoB1*), para identificar a resistência genotípica à isoniazida,
- a região do promotor -15/-8 do gene *inhA*, detetada por uma sonda específica (canal *inhA*), para identificar a resistência genotípica à isoniazida.

Além disso, o controlo interno exógeno é amplificado na TB1 PCR Mix e na TB2 PCR Mix. O controlo interno baseia-se numa sequência artificial (IC2) e é detetado por uma sonda específica (canal IC).

As sondas com a tecnologia ELITe MGB® são ativadas quando hibridizam com o produto específico da reação de amplificação. A emissão de fluorescência é medida e registada pelo instrumento.

No final do ciclo de amplificação, o instrumento ELITe InGenius analisa automaticamente:

- as curvas de fluorescência com vista a calcular os “ciclos de limiar” (Ct) para detecção do complexo MTB,
- as curvas de dissociação com vista a calcular as temperaturas de dissociação (Tm) que permitem identificar a presença de genes alvo normais e/ou com mutação (*rpoB*, *katG* e *inhA*).

O ensaio foi validado usando o sistema **ELITe InGenius**, começando por amostras de saliva, lavagens gástricas (BAL), aspirados broncoalveolares (BA), urina, fluidos de cavidades, biopsias e aspirados gástricos previamente fluidizados, descontaminados e desativados.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «**MDR/MTB ELITe MGB® Kit**» fornece duas misturas completas e **prontas a utilizar** para a amplificação em tempo real, TB1 PCR Mix e TB2 PCR Mix, **cada uma aliquoteada em quatro tubos de teste**. Cada tubo contém **280 µL** de solução, suficiente para **12 testes** em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 amostras por sessão) quando usado com o instrumento **ELITe InGenius**.

A mistura **TB1 PCR Mix** contém os primers e sonda específicos para:

- a sequência repetida do **complexo IS6110 MTB**. A sonda (MTB) é etiquetada com fluoróforo FAM, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma reação não fluorescente,
- a região de ponto quente bp 81 do gene **rpoB**. As sondas (*rpoB2*, *rpoB3* e *rpoB4*) são identificadas com os fluoróforos AP639, AP525 e AP593, respetivamente, estabilizadas pelo grupo MGB® e extintas por uma reação não fluorescente,
- a sequência artificial **IC2** do controlo interno. A sonda (IC) é etiquetada com fluoróforo AP680, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma reação não fluorescente.

A **TB2 PCR Mix** contém os primers e sonda específicos para:

- a região de ponto quente bp 81 do gene **rpoB**. A sonda (*rpoB1*) é etiquetada com fluoróforo AP639, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma reação não fluorescente,
- a região 315 do codão do gene **katG**. A sonda (*katG*) é etiquetada com fluoróforo FAM, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma reação não fluorescente,
- a região -15/-8 do codão do gene **inhA**. A sonda (*inhA*) é etiquetada com fluoróforo AP593, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma reação não fluorescente,

MDR/MTB ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do
ADN

REF RTS120ING

- a sequência artificial **IC2** do controlo interno. A sonda (IC) é etiquetada com fluoróforo AP680, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma reação não fluorescente.

Ambas as misturas de PCR TB1 e TB2 contêm o tampão, o cloreto de magnésio, os trifosfatos nucleótidos, os estabilizadores e a enzima de polimerase de ADN com ativação térmica (arranque a quente).

O produto é suficiente para **48 testes em associação com o ELITe InGenius**, incluindo controlos.

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação do risco
TB1 PCR Mix	Mistura de reação completa tampa VERMELHA	4 x 280 µL	-
TB2 PCR Mix	Mistura de reação completa tampa BRANCA	4 x 280 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água de grau de biologia molecular.

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ADN das amostras a serem analisadas, o controlo interno da extração e inibição, o controlo positivo de amplificação e os consumíveis **não** estão incluídos neste produto.

Para a extração de ADN automática, PCR em tempo real e interpretação dos resultados das amostras, é necessário o instrumento «**ELITe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) e os seguintes protocolos de Ensaio específicos:

- parâmetros para o positive control da amplificação «**MDR-MTB ELITe_PC**»,
- parâmetros para o negative control da amplificação «**MDR-MTB ELITe_NC**»
- parâmetros para amostras a serem analisadas «**MDR-MTB ELITe_SP_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_BAL_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_U_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_CL_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_B_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_GA_200_100**».

Com o instrumento «**ELITe InGenius**» são necessários os seguintes produtos genéricos:

- cartuchos de extração «**ELITe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumíveis para extração e amplificação «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS),
- cartuchos de amplificação «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- pontas «**300 µL Filter tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),
- caixas «**ELITe InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

Como modelo do controlo interno da extração e inibição, é necessário o produto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTCPE). Esta é uma solução estabilizada contendo ADNs plasmídeos e ARN genómico em fago.

Como modelo do positive control da amplificação, é necessário o produto específico «**MDR MTB -**

ELITE Positive Control» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR120ING). Esta é uma solução estabilizada de ADNs plasmídeos.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido exclusivamente para utilização *in vitro*.

Avisos e precauções gerais

As amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose devem ser manuseadas segundo os regulamentos estatais ou locais em matéria de práticas seguras (ambiente de trabalho e formação dos profissionais).

As amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose devem ser inativadas antes da utilização em associação com o instrumento ELITE InGenius.

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Os materiais que entrem em contacto com as amostras biológicas devem ser colocados em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.

Leia atentamente todas as instruções fornecidas com o produto antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular requerem colaboradores qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou à contaminação da amostra por produtos de amplificação.

São necessárias batas de laboratório, luvas e ferramentas para preparação da sessão de trabalho.

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras inativadas devem ser manuseadas sob um exaustor de fluxo de ar laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

As PCR Cassettes devem ser manuseadas de modo a reduzir, tanto quanto possível, a difusão do produto de amplificação para o ambiente, para evitar a contaminação da amostra e do reagente.

Avisos e precauções específicos para os componentes

As **misturas de PCR TB1 e TB2** têm de ser armazenadas a -20 °C no escuro.

As **misturas de PCR TB1 e TB2** podem ser congeladas e descongeladas até um máximo de **sete vezes**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Amostras de saliva

As amostras de saliva para extração de ADN devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes do laboratório de micobacteriologia e transportadas e armazenadas a +2/+8 °C durante um período máximo de dois dias. As amostras devem ser liquefeitas com uma solução de N-acetil-L-cisteína e descontaminadas com solução de hidróxido de sódio (manual do laboratório de micobacteriologia, Iniciativa Laboratorial Global). A amostra liquefeita e descontaminada deve de seguida ser inativada a 95 °C durante 30 minutos. Para a análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra inativada para o **«Extraction tube»** fornecido com o **«ELITE InGenius SP 200 Consumable Set»**.

As amostras liquefeitas e descontaminadas de espeto podem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de um mês ou a -70 °C durante períodos mais longos. Evite ciclos de congelação/descongelação.

Nota: para realizar a extração do ADN a partir das amostras de saliva com o **ELITE InGenius** e o **ELITE InGenius Software** versão **1.3** (ou versões posteriores), use o protocolo de ensaio **MDR-MTB ELITE_SP_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE - Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Lavagem broncoalveolar (BAL), aspirados brônquicos (BA)

As amostras de BAL/BA para extração de ADN devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes do laboratório de micobacteriologia e transportadas e armazenadas a +2/+8 °C durante um período máximo de dois dias. As amostras devem ser liquefeitas com uma solução de N-acetil-L-cisteína e descontaminadas com solução de hidróxido de sódio (manual do laboratório de micobacteriologia, Iniciativa Laboratorial Global). A amostra liquefeita e descontaminada deve de seguida ser inativada a 95 °C durante 30 minutos. Para a análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra inativada para o **«Extraction tube»** fornecido com o **«ELITE InGenius SP 200 Consumable Set»**.

As amostras de BAL/BA liquefeitas e descontaminadas podem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de um mês ou a -70 °C durante períodos mais longos. Evite ciclos de congelação/descongelação.

Nota: para realizar a extração do ADN a partir das amostras de BAL/BA com o **ELITE InGenius** e o **software do ELITE InGenius** versão **1.3** (ou versões posteriores), use o Protocolo do ensaio **MDR-MTB ELITE_BAL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE - Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Urina

As amostras de urina para extração de ADN devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes do laboratório de micobacteriologia e transportadas e armazenadas a +2/+8 °C durante um período máximo de dois dias. As amostras devem ser concentradas e descontaminadas com solução de hidróxido de sódio (manual do laboratório de micobacteriologia, Iniciativa Laboratorial Global) A amostra concentrada e descontaminada deve de seguida ser inativada a 95 °C durante 30 minutos. Para a análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra inativada para o **«Extraction tube»** fornecido com o **«ELITE InGenius SP 200 Consumable Set»**.

As amostras de urina concentradas e descontaminadas podem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de um mês ou a -70 °C durante períodos mais longos. Evite ciclos de congelação/descongelação.

Nota: para realizar a extração do ADN a partir das amostras de urina com o **ELITE InGenius** e o **software do ELITE InGenius** versão **1.3** (ou versões posteriores), use o Protocolo do ensaio **MDR-MTB ELITE_U_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE - Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Fluidos de cavidades

As amostras de fluidos de cavidades para extração de ADN devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes do laboratório de micobacteriologia e transportadas e armazenadas a +2/+8 °C durante um período máximo de dois dias. As amostras devem ser concentradas e descontaminadas com solução de hidróxido de sódio (manual do laboratório de micobacteriologia, Iniciativa Laboratorial Global). A amostra concentrada e descontaminada deve de seguida ser inativada a 95 °C durante 30 minutos. Para a análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra inativada para o **“Extraction tube”** fornecido com o **«ELITe InGenius SP 200 Consumable Set»**.

As amostras concentradas e descontaminadas de fluido cavitário podem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de um mês ou a -70 °C durante períodos mais longos. Evite ciclos de congelação/descongelação.

Note:: para realizar a extração do ADN a partir das amostras de fluidos de cavidades com o **ELITe InGenius** e o **software do ELITe InGenius** versão **1.3** (ou versões posteriores), use o Protocolo do ensaio **MDR-MTB ELITe_CL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o CPE - Internal Control a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Biopsias

As amostras de biopsias para extração de ADN devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes do laboratório de micobacteriologia e transportadas e armazenadas a +2/+8 °C durante um período máximo de dois dias. Decomponha as amostras de acordo com os procedimentos laboratoriais e descontamine-as com uma solução de hidróxido de sódio (manual do laboratório de micobacteriologia, Iniciativa Laboratorial Global). A amostra descontaminada deve de seguida ser inativada a 95 °C durante 30 minutos. Para a análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra inativada para o **“Extraction tube”** fornecido com o **«ELITe InGenius SP 200 Consumable Set»**.

As amostras descontaminadas de biopsia podem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de um mês ou a -70 °C durante períodos mais longos. Evite ciclos de congelação/descongelação.

Nota: para realizar a extração do ADN a partir das amostras de biopsia com o **ELITe InGenius** e o **software do ELITe InGenius** versão **1.3** (ou versões posteriores), use o Protocolo do ensaio **MDR-MTB ELITe_B_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o CPE - Internal Control a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Aspirados gástricos

As amostras de aspirados gástricos para extração de ADN devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes do laboratório de micobacteriologia e transportadas e armazenadas a +2/+8 °C durante um período máximo de dois dias. As amostras devem ser liquefeitas com uma solução de N-acetil-L-cisteína e descontaminadas com solução de hidróxido de sódio (manual do laboratório de micobacteriologia, Iniciativa Laboratorial Global). A amostra liquefeita e descontaminada deve de seguida ser inativada a 95 °C durante 30 minutos. Para a análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra inativada para o **“Extraction tube”** fornecido com o **«ELITe InGenius SP 200 Consumable Set»**.

As amostras liquefeitas e descontaminadas de aspirado gástrico podem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de um mês ou a -70 °C durante períodos mais longos. Evite ciclos de congelação/descongelação.

Nota: para realizar a extração do ADN a partir das amostras de aspirados gástricos com o **ELITe InGenius** e o **software do ELITe InGenius** versão **1.3** (ou versões posteriores), use o Protocolo do ensaio **MDR-MTB ELITe_GA_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o CPE - Internal Control a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Substâncias interferentes

Os dados disponíveis relativos à inibição causada por fármacos e outras substâncias são comunicados no parágrafo “Substâncias interferentes” do capítulo “Características de desempenho”.

Controlos de amplificação

Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar os controlos de amplificação para o lote do reagente de amplificação que será usado nos testes:

- como Positive Control da amplificação, use o reagente **TB Positive Control** (não fornecido com este kit) em associação com o Protocolo **MDR-MTB ELITe_PC**,
- como negative control da amplificação (**TB Negative Control**), use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo **MDR-MTB ELITe_NC**.

Nota: O sistema **ELITe InGenius** requer resultados aprovados e válidos dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados.

Os resultados do controlo da amplificação, aprovados e guardados na base de dados, irão expirar **após 15 dias**. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Positive e Negative Controls em associação com o lote do reagente de amplificação.

Para além disso, os controlos da amplificação devem ser novamente executados quando:

- for iniciado um novo lote de reagentes de amplificação,
- os resultados dos controlos da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizado qualquer serviço de manutenção significativo no instrumento **ELITe InGenius**.

Controlos da qualidade

É recomendada a validação planeada do procedimento de extração e amplificação. Podem ser usadas amostras testadas ou material de referência certificado.

PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do **MDR/MTB ELITe MGB® Kit** com o sistema **ELITe InGenius** consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema,
- preparação da sessão,
- revisão e aprovação de resultados.

Verificação da prontidão do sistema

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o instrumento **ELITe InGenius** e selecionar o modo de início de sessão **"CLOSED"** (Fechado),

verificar que os controlos da amplificação (Controls, TB Positive Control, TB Negative Control) foram executados em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado e que os resultados são aprovados e válidos (Estado). Se não existirem resultados de controlo da amplificação aprovados ou válidos, crie os mesmos como descrito nos parágrafos seguintes,

- escolher o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Assay Protocols (Protocolo de Ensaio) fornecidos pela ELITechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits **ELITe MGB®**, o instrumento **ELITe InGenius** e a matriz citada.

Os protocolos de ensaio disponíveis com o produto **MDR/MTB ELITe MGB® Kit** estão descritos na tabela seguinte:

Protocolo de ensaio para o produto MDR/MTB ELITe MGB® Kit, para a detecção da tuberculose e identificação da resistência genotípica do complexo MTB			
Nome	Matriz	Relação de unidades	Funcionalidades
MDR-MTB ELITe_SP_200_100	Expetoração	Positivo / negativo / resistência a positiva / resistência a negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_BAL_200_100	BAL/BA	Positivo / negativo / resistência a positiva / resistência a negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_U_200_100	Urina	Positivo / negativo / resistência a positiva / resistência a negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_CL_200_100	Fluidos de cavidades	Positivo / negativo / resistência a positiva / resistência a negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_B_200_100	Biopsias	Positivo / negativo / resistência a positiva / resistência a negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
MDR-MTB ELITe_GA_200_100	Aspirados gástricos	Positivo / negativo / resistência a positiva / resistência a negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

Nota: Nos ensaios para a detecção da tuberculose e a identificação da resistência genotípica do complexo MTB, são necessárias **TB1 PCR Mix** e **TB2 PCR Mix**.

Se o protocolo do ensaio que precisa não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup da sua localidade.

Preparação da sessão

O produto **MDR/MTB ELITe MGB® Kit** pode ser usado com o sistema **ELITe InGenius** para realizar:

- A. Execução integrada (Extract + PCR) (Extrair + PCR),
- B. Execução de amplificação (PCR Only) (Apenas PCR),
- C. Execução de Controlo positivo e negativo da amplificação (Apenas PCR),

Todos os parâmetros necessários para a sessão estão incluídos no Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) disponível no instrumento e são automaticamente recuperados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: O sistema **ELITe InGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information Server” (servidor de informação da localização - LIS) que permite enviar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Estão descritos a seguir os passos principais para a preparação dos três tipos de execução.

A. Execução integrada

Para configurar uma execução integrada com extração e amplificação da amostra, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Descongele os tubos de teste contendo a TB1 PCR Mix e a TB2 PCR Mix. Cada tubo de teste é suficiente para 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 amostras por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele os tubos de teste contendo a TB1 PCR Mix e a TB2 PCR Mix no escuro pois estes reagentes são sensíveis à luz.

2. Descongele os tubos de teste CPE para a sessão. Cada tubo de teste é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente e centrifugue os tubos de teste durante 5 segundos.
3. Selecione “Perform Run” a partir do ecrã “Home”.
4. Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” está definido para 200 µL e que o “Extracted Elute Volume” é de 100 µL.
5. Para cada Rastreio de interesse preencha a “SampleID” (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
6. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Ensaio” (por ex., MDR MTB ELITe_SP_200_100).
7. Certifique-se de que o “Protocol” (Protocolo) apresentado é: “Extract + PCR”(Extrair + PCR).
8. Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna “Sample Position” (Posição da amostra) e selecione “Extraction Tube” (Tubo de extração). Selecione “Next” para continuar a preparação.
9. Carregue CPE, TB1 PCR Mix e TB2 PCR Mix no Inventory Block selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão “Next” para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Tip Racks (Suportes de Ponta) na “Inventory Area” (área dos reagentes) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão “Next” para continuar a preparação.
11. Carregue as “PCR Cassettes”, os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 200”, todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas, seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione “Start” (Iniciar) para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no “Tubo de eluição” deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: As misturas de PCR podem ser mantidas guardadas no bloco refrigerado durante um máximo de 7 sessões de trabalho de 3 horas cada.

B. Execução da amplificação

Para preparar uma execução de amplificação a iniciar a partir de Ácidos nucleicos extraídos, realize os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Descongele os tubos de teste contendo a TB1 PCR Mix e a TB2 PCR Mix. Cada tubo de teste é suficiente para 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 amostras por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele os tubos de teste contendo a TB1 PCR Mix e a TB2 PCR Mix no escuro pois estes reagentes são sensíveis à luz.

2. Selecione “Perform Run” (Executar) a partir do ecrã “Home” (Início).
3. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o “Extracted Elute Volume” (Volume de eluição do extraído) é de 100 µL.
4. Para cada Rastreio de interesse preencha a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
5. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Assay” (por ex., MDR MTB ELITe_SP_200_100).
6. Selecione “PCR Only” (apenas PCR) na coluna “Protocol” (Protocolo).
7. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna “Sample Position” (Posição da amostra) é “Elution Tube (bottom row)” (Tubo de eluição [linha inferior]). Selecione “Next” para continuar a preparação.
8. Carregue a TB1 PCR Mix e TB2 PCR Mix no Inventory Block selecionado seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Tip Racks (Suportes de Ponta) na “Inventory Area” (área dos reagentes) selecionada seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar a preparação.
10. Carregue as “Cassetes PCR” e as amostras de Ácidos nucleicos extraídas seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar a preparação.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione “Start” (Iniciar) para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída no “Tubo de eluição” deve ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: As misturas de PCR podem ser mantidas guardadas no bloco refrigerado durante um máximo de 7 sessões de trabalho de 3 horas cada.

C. Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo

Para preparar a execução de amplificação para o Positive Control e Negative Control, realize os passos seguintes em conformidade com a GUI:

1. Descongele os tubos de teste contendo a TB1 PCR Mix e a TB2 PCR Mix. Cada tubo de teste é suficiente para 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 amostras por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele os tubos de teste contendo a TB1 PCR Mix e a TB2 PCR Mix no escuro pois estes reagentes são sensíveis à luz.

2. Descongele o tubo TB Positive Control para a sessão. Cada tubo é suficiente para 2 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 100 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution Tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Início).
5. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluição do extraído) é de 100 µL.
6. No Track de interesse, selecione o "Assay Protocol" (Protocolo de ensaio) a ser usado na coluna "Assay" (Ensaio).
7. Para o positive control, selecione MDR-MTB ELITe_PC na coluna "Assay" e preencha o número do lote e a data de validade do positive control TB.
8. Para o negative control, selecione MDR-MTB ELITe_NC na coluna "Assay" e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
9. Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a TB1 PCR Mix e TB2 PCR Mix no Inventory Block selecionado seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue e verifique os Tip Racks (Suportes de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) selecionada seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue as "PCR Cassettes", o tubo TB Positive Control e o tubo de Negative Control seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
13. Feche a porta do instrumento.
14. Pressione "Start" (Iniciar) para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução o restante Positive Control deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. Evite derramar o Controlo positivo. O restante Negative Control deve ser eliminado.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: As misturas de PCR podem ser mantidas guardadas no bloco refrigerado durante um máximo de 7 sessões de trabalho de 3 horas cada.

Revisão e aprovação de resultados

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã “Results Display” (Exibição dos resultados). Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” ou “Track Report”). Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: O sistema **ELITe InGenius** pode ser ligado ao “Location Information Server” (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível enviar os resultados da sessão de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Deteção de tuberculose e identificação da resistência genotípica do complexo MTB

O sistema **ELITe InGenius** gera os resultados utilizando o produto **MDR/MTB ELITe MGB® Kit** através do seguinte procedimento:

- A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação,
- B. Validação dos resultados da amostra,
- C. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas alvo (MTB, rpoB1, rpoB2, rpoB3, rpoB4, katG e inhA) nas reações de amplificação de positive control e negative control são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos Protocolos de ensaio “MDR-MTB ELITe_PC” e “MDR-MTB ELITe_NC”.

Os resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação usado, são registados na base de dados (Controls). Podem ser visualizados e aprovados por pessoal qualificado como o “Administrator” ou “Analyst”, seguindo as instruções na GUI.

Nota: O positive control e o negative control são processados em associação com ambas as TB1 PCR Mix e TB2 PCR Mix; por conseguinte, os resultados do controlo têm de ser aprovados para ambas as misturas de PCR. Por defeito, a GUI mostra os resultados do controlo para a TB1 PCR Mix (controlos). Ao clicar no campo ensaio, a janela do ensaio abre-se e a TB2 PCR Mix pode ser selecionada, com vista a aprovar os resultados do controlo relacionados.

Os resultados da amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar **após 15 dias**.

Os resultados das execuções de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são usados pelo software do instrumento para preparar os “Gráficos de controlo”. São requeridos pelo menos quatro resultados de positive Control e negative control de quatro execuções diferentes. Após isso, os resultados do Positive Control e Negative Control são usados para monitorização dos desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: Se o resultado do Positive Control ou Negative Control da amplificação não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem “Failed” no ecrã “Controls” e não é possível aprovar o mesmo. Neste caso, devem ser repetidas as reações de amplificação de Positive Control ou Negative Control.

Nota: Se o Positive Control ou Negative Control é executado em conjunto com amostras a serem testadas e o respetivo resultado é inválido, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

B. Validação dos resultados das amostras

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas do alvo (MTB, rpoB1, rpoB2, rpoB3, rpoB4, katG, inhA) e pela sonda de controlo interno (IC) nas reações de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos protocolos de ensaio MDR-MTB ELITe_SP_200_100, MDR-MTB ELITe_BAL_200_100, MDR-MTB ELITe_U_200_100, MDR-MTB ELITe_CL_200_100, MDR-MTB ELITe_B_200_100, MDR-MTB ELITe_GA_200_100.

Os resultados são mostrados nos relatórios gerados pelo instrumento ("Exibição dos resultados").
A execução da amostra pode ser aprovada quando forem cumpridas as duas condições reportadas na tabela abaixo.

1) Positive control	Estado
TB Positive Control	APROVADO
2) Negative control	Estado
TB Negative Control	APROVADO

Para cada amostra, o resultado do ensaio é automaticamente interpretado pelo sistema começando a partir dos valores da Ct (para o complexo MTB e IC) e dos valores de Tm (para a análise de resistência e MTB), conforme estabelecido pelo algoritmo do **software ELITE InGenius** e os parâmetros do protocolo de ensaio.

A tabela seguinte apresenta as possíveis mensagens para o resultado da detecção do complexo MTB.

Resultado de uma sessão na amostra	Interpretação
MTB:DNA detetado	Foi detetado ADN do complexo de MTB na amostra em quantidades suficientes para executar a análise da resistência a antibióticos (ver tabela seguinte).
MTB:DNA Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado ADN do complexo MTB na amostra. A amostra é um negativo válido ou a concentração alvo está abaixo do Limite de detecção (LdD) do ensaio.
Invalid - Retest Sample (Inválido-Testar novamente a amostra)	Resultado do ensaio inválido devido a problemas com o controlo interno (extração incorreta ou transferência de inibidores). O teste tem de ser repetido.
Inconclusivo – Volte a testar a amostra	Resultado do ensaio indeterminado devido a problemas na detecção do complexo MTB. O teste tem de ser repetido.

As possíveis mensagens de resultados acerca da análise de resistência a antibióticos da amostra estão descritas na tabela seguinte.

Resultado de uma sessão na amostra	Interpretação
RIF:RESISTÊNCIA NEGATIVA	Não foram analisadas mutações na região do gene rpoB. A amostra pode ser sensível a rifampicina .
RIF:RESISTÊNCIA POSITIVA Sonda/s	Foram analisadas mutações na região do gene rpoB. A amostra pode ser resistente à rifampicina . As sondas que detetarem as mutações estão indicadas nos resultados.
INH:RESISTÊNCIA NEGATIVA	Não foram analisadas mutações nas regiões do gene katG e inhA. A amostra pode ser sensível à isoniazida .
INH:RESISTÊNCIA POSITIVA Sonda/s	Foram analisadas mutações nas regiões do gene katG e inhA. A amostra pode ser resistente à isoniazida . As sondas que detetarem as mutações estão indicadas nos resultados.
TIF: tipagem inválida - voltar a testar a amostra INH: tipagem inválida - voltar a testar a amostra	Resultado do ensaio inválido devido a problemas na análise da resistência a antibióticos. O teste tem de ser repetido.

Quando o ADN do complexo MTB é detetado na amostra e é realizada a análise para resistência a antibióticos, podem ocorrer mensagens de resultados em diferentes combinações (por ex., foi detetado ADN de MTB RIF: RESISTÊNCIA NEGATIVA, INH RESISTÊNCIA POSITIVA: katG, inhA).

Ocasionalmente, uma amostra positiva com título alto para ADN de MTB pode apresentar IC não detetado ou IC Ct superior ao valor-limite de IC (34). Este caso pode conduzir a resultados incorretos na tipagem da resistência (genes-alvo rpoB, katG, inhA) devido a uma extração incorreta ou à transferência de inibidores. (ver RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS).

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo “PCR Only” (Apenas PCR) diluído em água de qualidade para biologia molecular. Quando o volume do eluato não é suficiente, a amostra pode ser diluída a partir da extração de uma nova alíquota da amostra no modo “Extract + PCR” (Extrair+PCR) (ver RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS).

As amostras reportadas como “Invalid - Retest Sample” (Inválido - Voltar a testar a amostra) pelo **software ELITe InGenius** não são adequadas para interpretação dos resultados. Neste caso, o ADN do Internal Control não foi detetado eficientemente devido a problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos (ver RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS).

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo “PCR Only” (Apenas PCR) conforme está ou diluído em água de qualidade para biologia molecular. No caso de um segundo resultado inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo “Extract + PCR” (Extrair+PCR) (ver RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS).

As amostras reportadas como “Inconclusive - Retest Sample” (Inconclusivo - Voltar a testar a amostra) pelo **software ELITe InGenius** não são adequadas para interpretação dos resultados. Neste caso, ocorreu um erro na deteção do ADN do complexo MTB devido a problemas no passo de extração ou amplificação (transferência de inibidores na eluição, mistura de misturas de PCR), o que pode originar resultados incorretos.

As amostras reportadas como “RIF Typing Invalid - Retest Sample” (tipagem de RIF inválida - volte a testar a amostra) e “INH Typing Invalid - Retest Sample” (testagem de INH inválida - volte a testar a amostra) pelo **software ELITe InGenius** não são adequadas para a análise da resistência a antibióticos. Isto pode acontecer devido à baixa concentração de MTB na amostra, à insuficiência de ADN (MTB Ct > 31) para obter resultados corretos de forma reprodutível ou a problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição). No entanto, **as amostras são positivas para ADN do complexo MTB**.

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo “PCR Only” (Apenas PCR) conforme está ou diluído em água de qualidade para biologia molecular. No caso de um segundo resultado inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo “Extract + PCR” (Extrair+PCR) (ver RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS).

Nota: Quando for necessário retestar, tenha em consideração que o ensaio será realizado com ambas as TB1 PCR Mix e TB2 PCR Mix e, por conseguinte, o volume de eluição tem de ser suficiente para duas reações (pelo menos 50 µL).

Amostras reportadas como: “MTB DNA not detected or below the LoD” (ADN de MTB não detetado ou inferior ao LdD) são adequadas para análise mas não foi possível detetar ADN do complexo MTB. Neste caso não pode excluir-se que o ADN do complexo de MTB esteja presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver “Características de desempenho”).

Nota: Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente, em particular o teste fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana.

Os resultados da execução da amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Result Display (Exibição dos resultados)) por pessoal qualificado como “Administrator” (Administrador) ou “Analyst” (Analista), seguindo as instruções na GUI. A partir da janela “Result Display” (Exibição dos resultados) é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como “Sample Report” (Relatório da amostra) e “Track Report” (Relatório do rastreio).

C. Elaboração do relatório do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser exportados como “Sample Report” e “Track Report”.

O “Sample Report” apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho ordenada pela amostra selecionada (SID).

O "Relatório do rastreio" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho ordenados pelo Rastreio selecionado.

O "Sample Report" (Relatório da amostra) e o "Track Report" (Relatório da calha) podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Limite de detecção (LoD)

O limite de detecção (LdD) do produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit foi determinado em associação com amostras de saliva fluidizadas, descontaminadas e desativadas e com o sistema ELITE InGenius.

O LdD foi calculado através de testes a um painel de amostras de saliva MTB negativas certificadas e reforçadas com material de referência de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), estirpe H37Ra (ATCC), quantificado por amplificação em tempo real. Foram preparados nove níveis de diluição de MTB, desde 320 CFU/mL até 1 CFU/mL. Cada nível de diluição foi testado com 12 réplicas no sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

O LdD foi calculado usando regressão Probit como a concentração que tem uma probabilidade de 95% de ser positiva. O LdD estimado foi verificado através da análise de 20 réplicas de amostras de saliva reforçadas com material de referência de MTB, à concentração declarada. Além disso, o mesmo LdD foi também verificado para a matriz BAL/BA através da análise de 20 réplicas de amostras de BAL/BA reforçadas com material de referência de MTB, à concentração declarada. Os resultados obtidos corroboram o LdD declarado.

O LdD em associação com amostras de fluidos cavitários, urina e biopsias foi verificado pela análise de 20 réplicas de cada matriz reforçadas com material de referência de MTB a uma concentração de 20 CFU/mL. Os resultados obtidos corroboram o LdD declarado.

Os resultados finais são mostrados na tabela seguinte.

Limite de detecção com o sistema ELITE InGenius			
Matriz	LdD (CFU/mL)	Intervalo de confiança 95% (CFU/ml)	
		limite inferior	limite superior
Expetoração	6	4	15
BAL/BA	6	-	-
Fluido cavitário	20	-	-
Urina	20	-	-
Biópsia	20	-	-

Deteção da resistência à rifampicina e/ou isoniazida

A deteção da resistência à rifampicina e/ou isoniazida usando o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit em associação com o sistema ELITE InGenius foi avaliada através da análise de algumas amostras certificadas de ADN do genoma de isolados do complexo de MTB resistente a antibióticos (fornecidos por um laboratório externo) e ADNs plasmídeos, caracterizada pelas mutações indicadas na tabela seguinte.

Mutações na região do ponto quente bp 81 do gene rpoB (numeração dos codões de <i>E. coli</i>)
Q510L, L511P, L511R, Q513L, Q513P, M515I, D516V, D516Y, D516G, Q517P, S522L, S522P, H526L, H526Y, H526D, H526N, H526R, H526C, H526P, S531L, S531W, A532V, L533P, S531F
Mutações na região do codão 315 do gene katG
S315N, S315T, S315I, S315R
Mutações na região promotora do gene inhA
-15T, -8A, -8C, -7A

As amostras do ADN extraído foram diluídas e analisadas em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "PCR Only" (apenas PCR).

Todos os isolados testados foram positivos para MTB e foram corretamente tipados como resistentes à rifampicina e/ou isoniazida pelo produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit.

Eficiência da detecção (inclusividade)

A eficiência da detecção da espécie de micobactéria incluída no complexo *Mycobacterium tuberculosis* do produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit foi avaliada por análise *in silico* das sequências disponíveis na base de dados EBI ENA.

As regiões selecionadas para a hibridização dos primers e das sondas fluorescentes foram verificadas em relação ao alinhamento das sequências dos alvos de MTB (IS6110), *rpoB*, *katG* e *inhA*. As regiões de hibridização destacaram a conservação da sequência e a ausência de mutações significativas em *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*.

A eficiência da detecção de espécies de micobactéria incluídas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* foi igualmente verificada pela análise de um painel de ADN genómico certificado de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*.

As amostras do ADN extraído foram diluídas e analisadas em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "PCR Only" (apenas PCR).

Todos os isolados testados foram detetados como positivos para MTB pelo produto MDR MTB ELITE MGB® Kit.

Marcadores potencialmente interferentes

A potencial reatividade cruzada com outros alvos do produto MDR MTB ELITE MGB® Kit foi analisada por análise *in silico* de sequências disponíveis na base de dados EBI ENA.

As regiões selecionadas para hibridização dos primers e sondas fluorescentes foram verificadas em relação ao alinhamento das sequências procarióticas, incluindo de micobactérias não tuberculosas (NTM) e outros organismos que poderiam estar presentes nas amostras clínicas. As regiões de hibridização destacaram a ausência de homologias significativas e não indicaram uma potencial interferência.

A ausência de reatividade cruzada com NTM também foi verificada através de um painel de ADN genómico certificado de *M. avium*, *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*. Além disso, foi também analisado um painel de ADN genómico certificado de outros organismos potencialmente presentes em amostras de saliva: *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*.

As amostras do ADN extraído foram analisadas em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "PCR Only" (apenas PCR).

Todos os isolados foram negativos para MTB quando analisados com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit.

Substâncias interferentes

Um painel de substâncias potencialmente interferentes à concentração máxima relevante foi testado com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. As substâncias testadas foram antibióticos (rifampicina e isoniazida) e componentes da saliva (mucina, sangue humano total).

As substâncias foram adicionadas individualmente às amostras de saliva negativas para MTB positivadas com material de referência de *Mycobacterium tuberculosis* a uma concentração de cerca de 2500 CFU/mL.

As amostras foram testadas em 3 réplicas no sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

Substância	Concentração	Resultados corretos
Rifampicina	25 µg/ml	3/3
Isoniazida	50 µg/ml	3/3
Mucina suína	2% w/v (20 mg/ml)	3/3
Sangue total com EDTA	5% v/v	3/3

Foi demonstrado que nenhuma das substâncias testadas à concentração máxima relevante interfere com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit.

Repetibilidade

A repetibilidade dos resultados obtidos pelo produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit em associação com o sistema ELITE InGenius foi verificada através da análise de amostras positivas para MTB e negativas para MTB.

Uma amostra de saliva negativa para MTB foi positivada com materiais de referência de *Mycobacterium tuberculosis* a uma concentração de cerca de 2500 CFU / mL e uma amostra de saliva negativa para MTB foi analisada em três réplicas em duas sessões por dia, com o mesmo lote de produto (repetibilidade intra-sessão). Foram analisados três lotes de produto diferentes em três dias diferentes (repetibilidade interlote) com o mesmo instrumento e pelo mesmo operador.

As amostras foram processadas no sistema ELITE InGenius no modo “Extração + PCR”.

Os valores da Ct do alvo do complexo MTB (IS6110) e do alvo do controlo interno (IC2), bem como os valores da Tm de todos os alvos de agentes patogénicos (IS6110, rpoB, katG e inhA) foram usados para calcular o coeficiente de variação em percentagem (%CV), com vista a avaliar a repetibilidade, interpretada como imprecisão.

Segue-se o resumo dos resultados.

Alvo	Repetibilidade intra-sessão		Repetibilidade interlote	
	Ct média	%CV Ct	Ct média	%CV Ct
MTB	30,29	0,92	30,43	1,09
IC	29,11	1,91	29,89	2,54
Alvo	Tm médio	%CV Tm	Tm médio	%CV Tm
MTB	68,3	0,08	68,4	0,11
rpoB1	67,0	0,12	67,0	0,20
rpoB2	71,4	0,11	71,5	0,15
rpoB3	69,9	0,37	70,0	0,26
rpoB4	66,3	0,71	66,4	0,53
katG	70,8	0,08	70,8	0,13
inhA	67,7	0,24	67,0	0,20

A repetibilidade do produto MDR MTB ELITE MGB® Kit para cada alvo revelou uma %CV que não superou os 3%.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit em associação com o sistema ELITE InGenius foi verificada através da análise de amostras positivas para MTB e negativas para MTB.

Uma amostra de saliva negativa para MTB foi positivada com materiais de referência de *Mycobacterium tuberculosis* a uma concentração de cerca de 2500 CFU / mL e uma amostra de saliva negativa para MTB foi analisada em três réplicas em duas sessões por dia. Foram analisados três lotes diferentes do produto em três dias diferentes, em três instrumentos diferentes e por três operadores diferentes.

As amostras foram processadas no sistema ELITE InGenius no modo “Extração + PCR”.

Os valores da Ct do alvo de MTB (IS6110) e do alvo do controlo interno (IC2), bem como os valores da Tm dos alvos de agentes patogénicos (IS6110, rpoB, katG e inhA) foram usados para calcular o coeficiente de variação em percentagem (%CV), com vista a avaliar a reprodutibilidade, interpretada como imprecisão.

Segue-se o resumo dos resultados.

Reprodutibilidade		
Alvo	Ct média	%CV Ct
MTB	30,71	1,04
IC	30,88	2,39
Alvo	Tm médio	%CV Tm
MTB	68,4	0,23
rpoB1	66,9	0,19
rpoB2	71,5	0,21
rpoB3	70,0	0,30
rpoB4	66,4	0,51
katG	70,9	0,16
inhA	67,2	0,61

A reprodutibilidade do produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit para cada alvo revelou uma %CV que não superou os 3%.

Expectoração: Sensibilidade e especificidade do diagnóstico

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de 50 amostras clínicas de saliva positivas para MTB testadas por cultura.

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada usando 52 amostras clínicas de saliva negativas para MTB testadas por cultura.

As amostras de saliva foram colhidas, pré-tratadas (ver “Amostras e controlos”), colocadas em cultura e certificadas como positivas para MTB ou negativas para MTB por um laboratório externo. As amostras foram então inativadas e testadas com o produto MDR/MTB ELITE MGB® e o sistema ELITE InGenius no modo “Extract + PCR” (Extração + PCR).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

		Cultura		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	50	1	51
	Neg.	0	51	51
	Total	50	52	102

Todas as amostras positivas para MTB tiveram um resultado positivo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi de 100%.

Entre as amostras negativas para MTB, 52 deram um resultado válido, 51 deram um resultado negativo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. O resultado positivo discordante foi confirmado como positivo testando novamente a amostras de saliva. Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio foi de 98,1%.

Além disso, foram também testadas as mesmas amostras positivas para MTB e negativas para MTB por outro ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD e por microscopia de esfregaço AFB.

As amostras clínicas analisadas por outro ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD deram origem a 50 amostras positivas para MTB e 50 amostras negativas, tal como quando testado por cultura. A tabela seguinte resume a comparação dos resultados com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit.

		MDx CE-IVD Assay		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	50	1	51
	Neg.	0	51	51
	Total	50	52	102

Todas as amostras positivas para MTB tiveram um resultado positivo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi de 100%.

Entre as amostras negativas para MTB, 52 deram um resultado válido, 51 deram um resultado negativo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. Das 52 amostras válidas, 51 deram um resultado negativo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. O resultado positivo discordante foi confirmado como positivo testando novamente a amostras de saliva. Nestes testes, a especificidade de diagnóstico do ensaio foi de 98,1%.

As amostras clínicas testadas por microscopia de esfregaço AFB deram origem a 44 amostras positivas para MTB e 56 amostras negativas para MTB. A tabela seguinte resume a comparação dos resultados com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit.

		Microscopia de esfregaço AFB		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	44	7	51
	Neg.	0	51	51
	Total	44	58	102

Todas as amostras positivas para MTB tiveram um resultado positivo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit.

Entre as amostras negativas para MTB, 58 deram um resultado válido, 51 deram um resultado negativo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. Seis das 7 amostras discrepantes foram confirmadas como positivas por outros dois métodos de referência (cultura e ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD). O último resultado positivo discordante foi confirmado positivo por um novo teste da amostra de saliva individual com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit.

Expectoração: Confirmação de amostras positivas para MTB resistente a antibióticos

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB resistente a antibióticos, foi avaliada através da análise das seguintes amostras:

- 20 amostras de saliva clínicas positivadas com isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene rpoB),
- 20 amostras de saliva clínicas positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene katG),
- 20 amostras de saliva clínicas positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene inhA).

As amostras clínicas de saliva negativa para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Res. (rpoB)	INH Res. (katG)	INH Res. (inhA)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação rpoB)	20	20	0	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação katG)	20	0	17	0	3
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação inhA)	20	0	0	18	2

Todas as amostras resultaram positivas para MTB.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene rpoB) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à rifampicina.

Dezassete de 20 amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene katG) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida. Não foi possível tipar 3 amostras devido a um baixo sinal de MTB, tendo por conseguinte sido excluídas da análise.

Dezoito de 20 amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene inhA) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida. Não foi possível tipar 2 amostras devido a um baixo sinal de MTB, tendo por conseguinte sido excluídas da análise.

Nestes testes, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência ao antibiótico foi de 100%.

Expectoração: Confirmação de amostras MTB-positivo sensíveis a antibióticos

A especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB sensíveis a antibióticos, foi avaliada através da análise de 50 amostras clínicas de saliva positivas para MTB sensível a antibióticos.

As amostras de saliva foram colhidas, pré-tratadas (ver “Amostras e controlos”), colocadas em cultura e certificadas como positivas para MTB e sensíveis à rifampicina e isoniazida por um laboratório externo usando um teste de suscetibilidade antimicrobiana. As amostras foram então inativadas e testadas com o produto MDR/MTB ELITE MGB® e o sistema ELITE InGenius no modo “Extract + PCR” (Extração + PCR).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF resistência negativa + INH resistência negativa	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, sensível aos antibióticos	50	47	3

Todas as amostras resultaram positivas para MTB, e 47 de 50 foram corretamente tipadas como sendo possivelmente sensíveis à rifampicina e à isoniazida. Não foi possível tipar 3 amostras devido a um baixo sinal de MTB, tendo por conseguinte sido excluídas da análise.

Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos foi de 100%.

BAL / BA: Sensibilidade e especificidade do diagnóstico

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de 6 amostras clínicas de BAL/BA positivas para MTB testadas por cultura e 40 amostras clínicas positivadas de BAL/BA.

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada usando 40 amostras clínicas de saliva de BAL/BA negativas para MTB testadas por cultura.

As amostras de BAL/BA foram colhidas, pré-tratadas (ver “Amostras e controlos”), colocadas em cultura e certificadas como positivas para MTB ou negativas para MTB por um laboratório externo. As amostras positivadas foram adicionadas aos isolados de MTB sensíveis aos antibióticos, à concentração final de cerca de 20 CFU/mL. As amostras foram então inativadas e testadas com o produto MDR/MTB ELITE MGB® e o sistema ELITE InGenius no modo “Extract + PCR” (Extração + PCR).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

		Cultura		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	42	1	43
	Neg.	4	39	43
	Total	46	40	86

Entre as amostras positivas para MTB ou positivadas, 42 de 46 amostras resultaram positivas com o produto MDR/MTB ELITE MGB®. Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi de 91,3 %.

Entre as amostras negativas para MTB, 39 de 40 amostras deram um resultado negativo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio foi de 97,5 %.

BAL / BA: Confirmação de amostras positivas para MTB resistente a antibióticos

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB resistente a antibióticos, foi avaliada através da análise das seguintes amostras:

- 2 amostras clínicas de BAL/BA positivas para MTB testadas por cultura e resistentes à rifampicina e isoniazida
- 40 amostras clínicas de BAL/BA positivadas com isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene rpoB),
- 40 amostras clínicas de BAL/BA positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene katG),
- 40 amostras clínicas de BAL/BA positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação

do gene inhA).

As amostras clínicas de BAL/BA negativas para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITe MGB® Kit e o sistema ELITe InGenius no modo “Extract + PCR”.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Res. (rpoB)	INH Res. (katG)	INH Res. (inhA)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina e isoniazida	2	0	0	0	2
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação rpoB)	40	40	0	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação katG)	40	0	40	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação inhA)	40	0	0	39	1

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene rpoB) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à rifampicina.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene katG) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene inhA) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida. Não foi possível tipar 1 amostra devido a um baixo sinal de MTB, tendo por conseguinte sido excluídas da análise.

Nestes testes, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência ao antibiótico foi de 100%.

BAL / BA: Confirmação da ausência de mutação em amostras positivas para MTB

A especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB sensível a antibióticos, foi avaliada através da análise de 80 amostras clínicas de BAL/BA positivadas com transportador de isolado de MTB de uma mutação mas negativas para as outras duas.

As amostras clínicas de BAL/BA negativas para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITe MGB® Kit e o sistema ELITe InGenius no modo “Extract + PCR”.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação rpoB)	40	0	40	40	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação katG)	40	40	0	40	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação inhA)	40	39	39	0	1

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene rpoB foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes katG e inhA.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene katG foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes rpoB e inhA.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene inhA foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes rpoB e katG. Não foi possível tipar 1 amostra devido a um baixo sinal de MTB, tendo por conseguinte sido excluídas da análise.

Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos foi de 100%.

Urina: Sensibilidade e especificidade do diagnóstico

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de 12 amostras clínicas de urina positivas para MTB testadas por cultura e 8 amostras clínicas de urina positivadas.

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada usando 20 amostras clínicas de urina negativas para MTB testadas por cultura.

As amostras de urina foram colhidas, pré-tratadas (ver “Amostras e controles”), colocadas em cultura e certificadas como positivas para MTB ou negativas para MTB por um laboratório externo. As amostras positivadas foram adicionadas aos isolados de MTB sensíveis aos antibióticos, à concentração final de cerca de 20 CFU/mL. As amostras foram então inativadas e testadas com o produto MDR/MTB ELITE MGB® e o sistema ELITE InGenius no modo “Extract + PCR” (Extração + PCR).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

		Cultura		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	16	0	16
	Neg.	4	20	24
	Total	20	20	40

Entre as amostras positivas para MTB ou positivadas, 16 de 20 amostras resultaram positivas com o produto MDR/MTB ELITE MGB®. Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi de 80 %.

Entre as amostras negativas para MTB, todas as amostras deram um resultado negativo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio foi de 100 %.

Urina: Confirmação de amostras positivas para MTB resistente a antibióticos

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB resistente a antibióticos, foi avaliada através da análise das seguintes amostras:

- 20 amostras clínicas de urina positivadas com isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene *rpoB*),
- 20 amostras clínicas de urina positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *katG*),
- 20 amostras clínicas de urina positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *inhA*).

As amostras clínicas de urina negativa para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo “Extract + PCR”.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Res. (<i>rpoB</i>)	INH Res. (<i>katG</i>)	INH Res. (<i>inhA</i>)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação <i>rpoB</i>)	20	20	0	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação <i>katG</i>)	20	0	20	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação <i>inhA</i>)	20	0	0	20	0

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene *rpoB*) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à rifampicina.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *katG*) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *inhA*) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida.

Nestes testes, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência ao antibiótico foi de 100%.

Urina: Confirmação da ausência de mutação em amostras positivas para MTB

A especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB sensível a antibióticos, foi avaliada através da análise de 40 amostras clínicas de urina positivadas com transportador de isolado de MTB de uma mutação mas negativas para as outras duas.

As amostras clínicas de urina negativa para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação rpoB)	20	0	20	20	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação katG)	20	20	0	20	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação inhA)	20	20	20	0	0

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene rpoB foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes katG e inhA.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene katG foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes rpoB e inhA.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene inhA foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes rpoB e katG.

Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos foi de 100%.

Biopsia: Sensibilidade e especificidade do diagnóstico

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de 22 amostras clínicas de biopsia positivas para MTB testadas por cultura e 20 amostras clínicas de urina positivadas.

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada usando 40 amostras clínicas de biopsia negativas para MTB testadas por cultura.

As amostras de biopsia foram colhidas, pré-tratadas (ver "Amostras e controlos"), colocadas em cultura e certificadas como positivas para MTB ou negativas para MTB por um laboratório externo. As amostras positivadas foram adicionadas aos isolados de MTB sensíveis aos antibióticos, à concentração final de cerca de 20 CFU/mL. As amostras foram então inativadas e testadas com o produto MDR/MTB ELITE MGB® e o sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

		Cultura		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	38	0	38
	Neg.	4	40	44
	Total	42	40	82

Entre as amostras positivas para MTB ou positivadas, 38 de 42 amostras resultaram positivas com o produto MDR/MTB ELITE MGB®. Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi de 90,5 %.

Entre as amostras negativas para MTB, todas as amostras deram um resultado negativo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio foi de 100 %.

Biopsia: Confirmação de amostras positivas para MTB resistente a antibióticos

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB resistente a antibióticos, foi avaliada através da análise das seguintes amostras:

- 40 amostras clínicas de biopsia positivadas com isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene rpoB),
- 40 amostras clínicas de biopsia positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene katG),
- 40 amostras clínicas de biopsia positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene inhA).

As amostras clínicas de biopsia negativa para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Res. (rpoB)	INH Res. (katG)	INH Res. (inhA)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação rpoB)	40	40	0	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação katG)	40	0	40	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação inhA)	40	0	0	40	0

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene rpoB) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à rifampicina.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene katG) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene inhA) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida.

Nestes testes, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência ao antibiótico foi de 100%.

Biopsia: Confirmação da ausência de mutação em amostras positivas para MTB

A especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB sensíveis a antibióticos, foi avaliada através da análise de 80 amostras clínicas de biopsia positivadas com transportador de isolado de MTB de uma mutação mas negativas para as outras duas.

As amostras clínicas de biopsia negativa para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação rpoB)	40	0	40	40	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação katG)	40	40	0	40	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação inhA)	40	40	40	0	0

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene rpoB foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes katG e inhA.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene katG foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes rpoB e inhA.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene inhA foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes rpoB e katG.

Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos foi de 100%.

Fluidos cavitários: Sensibilidade e especificidade do diagnóstico

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de 20 amostras clínicas de fluidos cavitários positivas para MTB testadas por cultura e 20 amostras clínicas de fluidos cavitários positivadas.

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada usando 40 amostras clínicas de fluidos cavitários negativas para MTB testadas por cultura.

As amostras de fluidos cavitários foram colhidas, pré-tratadas (ver “Amostras e controles”), colocadas em cultura e certificadas como positivas para MTB ou negativas para MTB por um laboratório externo. As amostras positivadas foram adicionadas aos isolados de MTB sensíveis aos antibióticos, à concentração final de cerca de 20 CFU/mL. As amostras foram então inativadas e testadas com o produto MDR/MTB ELITE MGB® e o sistema ELITE InGenius no modo “Extract + PCR” (Extração + PCR).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

		Cultura		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	39	0	39
	Neg.	1	40	41
	Total	40	40	80

Entre as amostras positivas para MTB ou positivadas, 39 de 40 amostras resultaram positivas com o produto MDR/MTB ELITE MGB®. Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi de 97,5 %.

Entre as amostras negativas para MTB, todas as amostras deram um resultado negativo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio foi de 100 %.

Fluidos cavitários: Confirmação de amostras positivas para MTB resistente a antibióticos

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB resistente a antibióticos, foi avaliada através da análise das seguintes amostras:

- 40 amostras clínicas de fluidos cavitários positivadas com isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene *rpoB*),
- 40 amostras clínicas de fluidos cavitários positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *katG*),
- 40 amostras clínicas de fluidos cavitários positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *inhA*).

As amostras clínicas de fluidos cavitários negativas para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo “Extract + PCR”.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Res. (<i>rpoB</i>)	INH Res. (<i>katG</i>)	INH Res. (<i>inhA</i>)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação <i>rpoB</i>)	40	40	0	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação <i>katG</i>)	40	0	40	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação <i>inhA</i>)	40	0	0	40	0

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene *rpoB*) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à rifampicina.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *katG*) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *inhA*) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida.

Nestes testes, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência ao antibiótico foi de 100%.

Fluidos cavitários: Confirmação da ausência de mutação em amostras positivas para MTB

A especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB sensíveis a antibióticos, foi avaliada através da análise de 80 amostras clínicas de fluidos cavitários positivadas com transportador de isolado de MTB de uma mutação mas negativas para as outras duas.

As amostras clínicas de fluidos cavitários negativas para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação rpoB)	40	0	40	40	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação katG)	40	40	0	40	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação inhA)	40	40	40	0	0

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene rpoB foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes katG e inhA.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene katG foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes rpoB e inhA.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene inhA foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes rpoB e katG.

Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos foi de 100%.

Aspirado gástrico: Sensibilidade e especificidade do diagnóstico

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de 22 amostras clínicas de aspirado gástrico positivas para MTB testadas por cultura.

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada usando 20 amostras clínicas de aspirado gástrico negativas para MTB testadas por cultura.

As amostras de aspirado gástrico foram colhidas, pré-tratadas (ver "Amostras e controlos"), colocadas em cultura e certificadas como positivas para MTB ou negativas para MTB por um laboratório externo. As amostras foram então inativadas e testadas com o produto MDR/MTB ELITE MGB® e o sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

		Cultura		
		Pos.	Neg.	Total
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	18	0	18
	Neg.	4	20	24
	Total	22	20	42

Entre as amostras positivas para MTB ou positivadas, 18 de 22 amostras resultaram positivas com o produto MDR/MTB ELITE MGB®. Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi de 81,8 %.

Entre as amostras negativas para MTB, todas as amostras deram um resultado negativo com o produto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio foi de 100 %.

Aspirado gástrico: Confirmação de amostras positivas para MTB resistente a antibióticos

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB resistente a antibióticos, foi avaliada através da análise das seguintes amostras:

- 20 amostras clínicas de aspirado gástrico positivadas com isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene *rpoB*),
- 20 amostras clínicas de aspirado gástrico positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *katG*),
- 20 amostras clínicas de aspirado gástrico positivadas com isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *inhA*).

As amostras clínicas de aspirado gástrico negativas para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Res. (rpoB)	INH Res. (katG)	INH Res. (inhA)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação <i>rpoB</i>)	20	20	0	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação <i>katG</i>)	20	0	20	0	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação <i>inhA</i>)	20	0	0	20	0

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à rifampicina (mutação do gene *rpoB*) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à rifampicina.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *katG*) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB resistente à isoniazida (mutação do gene *inhA*) foram corretamente tipadas como possivelmente resistentes à isoniazida.

Nestes testes, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio de resistência ao antibiótico foi de 100%.

Aspirado gástrico: Confirmação da ausência de mutação em amostras positivas para MTB

A especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos, como confirmação das amostras positivas para MTB sensível a antibióticos, foi avaliada através da análise de 40 amostras clínicas de aspirado gástrico positivadas com transportador de isolado de MTB de uma mutação mas negativas para as outras duas.

As amostras clínicas de aspirado gástrico negativas para MTB foram positivadas à concentração final de cerca de 5000 CFU/mL com isolados de MTB certificados por um laboratório externo para mutações num dos três genes alvo usando um ensaio de diagnóstico molecular com marcação CE-IVD. As amostras foram testadas com o MDR/MTB ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Positivo para MTB	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Tipagem inválida
Amostras positivas para MTB, resistentes à rifampicina (mutação <i>rpoB</i>)	20	0	20	20	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação <i>katG</i>)	20	20	0	20	0
Amostras positivas para MTB, resistentes à isoniazida (mutação <i>inhA</i>)	20	20	20	0	0

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene *rpoB* foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes *katG* e *inhA*.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene *katG* foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes *rpoB* e *inhA*.

Todas as amostras positivadas com um isolado de MTB com uma mutação do gene inhA foram corretamente tipadas como não contendo mutação para os genes rpoB e katG.

Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio de resistência a antibióticos foi de 100%.

Convém notar: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto "MTB ELITE MGB Kit", FTP 120ING.

REFERÊNCIAS

- Thierry D. et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 188
Heep M. et al. (2001) JCM 39: 107 – 110
Seifert M. et al. (2015) PLOS ONE DOI 10.1371: 1 - 13
E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30
Mycobacteriology laboratory manual (Global Laboratory Initiative, First edition, April 2014).

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com as amostras clínicas de saliva, lavagens broncoalveolares (BAL), aspirados brônquicos (BA), urina, fluidos cavitários, biopsias e aspirados gástricos liquefeitos, descontaminados e inativados.

Não use este produto com amostras contendo mucina em concentração superior a 2%: a mucina inibe a reação de amplificação de ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Neste momento não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com as seguintes amostras clínicas: líquido cefalorraquidiano (LCR), materiais necróticos, pus, fezes, sangue total.

Os resultados obtidos com este produto dependem de uma identificação, uma recolha, um armazenamento de transporte e um processamento adequados das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com os produtos para extração de ácido nucleico.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em Tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas a partir de amostras positivas, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar contaminações cruzadas. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário e áreas de trabalho que sejam adequados para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário especial e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova tecnologia.

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN alvo não foi detetado no ADN extraído da amostra. Não pode excluir-se o facto de o ADN alvo ter um título inferior ao limite de deteção do produto (ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do controlo interno. Neste caso, a amostra deve ser novamente testada, começando pela extração, o que pode originar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Os resultados obtidos com este produto sobre a possível resistência a rifampicina e/ou à isoniazida do MTB estão limitados à deteção das principais mutações como indicado na Secção "Princípios do Ensaio". Outras mutações não detetadas por este produto podem estar associadas à resistência a rifampicina e/ou isoniazida. Por outro lado, podem ser detetadas mutações silenciosas por este produto, mas não estão associadas a resistência à rifampicina e/ou isoniazida. O teste de suscetibilidade antimicrobiana fenotípico é então requerido para confirmar a suscetibilidade do MTB à rifampicina e/ou

isoniazida.

Possíveis polimorfismos na região do ADN alvo abrangidos pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção do ADN alvo.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e outros testes laboratoriais efetuados ao doente.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de resultados inválidos, falsos positivos e falsos negativos obtidos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Em alguns casos, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o paciente.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Reação de Positive Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na preparação da sessão.	Verifique a posição da PCR Mix e do Positive Control. Verifique os volumes da PCR Mix e do Positive Control.
Degradação do Positive Control.	Utilize uma nova alíquota de Positive Control.
Degradação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Erro do instrumento.	Contacte a assistência técnica da ELITechGroup.
Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na preparação da sessão.	Verifique a posição da PCR Mix e do negative control. Verifique os volumes da PCR Mix e do negative control.
Contaminação do controlo negativo	Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da PCR Mix.	Utilize novas alíquotas de misturas de PCR.
Contaminação da área de extração, dos suportes ou dos blocos de inventário.	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.
Erro do instrumento.	Contacte a assistência técnica da ELITechGroup.
Reação da amostra inválida	
Resultados inconclusivos / Tipagem inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na preparação da sessão.	Verifique a posição da PCR Mix e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix e da amostra.
Degradação do Controlo Interno.	Utilize novas alíquotas de controlo interno.
Inibição devido a substâncias que interferem na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição de 1:2 em água de grau para biologia molecular de amostra de eluato numa sessão "PCR only" (Apenas PCR). Repita a extração com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular da amostra numa sessão "Extract + PCR" (Extrair+ PCR).
Degradação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Erro do instrumento.	Contacte a assistência técnica da ELITechGroup.

MTB DNA detetado com IC não detetado ou IC Ct superior ao valor-limite de IC	
Causas possíveis	Soluções
Possível inibição na amostra	Repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de grau de biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" (apenas PCR). Repita a extração a partir de uma diluição 1:2 de uma nova alíquota da amostra em grau de biologia molecular.

Erro 30103	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado. Se for necessário um valor de Ct: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" (Apenas PCR) ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra primária numa sessão "Extract + PCR" (Extração + PCR).

SÍMBOLOS



Número do catálogo.



Limite máximo da temperatura.



Código de lote.



Data de validade (último dia do mês).



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*.



Conteúdo suficiente para "N" testes.



Consulte as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES

Qualquer incidente grave ocorrido relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e às autoridades competentes do Estado-Membro em que o utilizador e/ou o doente se encontram localizados. Para informar a ELITechGroup S.p.A., fabricante deste dispositivo, utilize o seguinte endereço de e-mail: egspa.vigilance@elitechgroup.com.

Um "Resumo da segurança e desempenho" será disponibilizado ao público através da base de dados europeia para dispositivos médicos (Eudamed) quando este sistema informático estiver operacional. Antes da notificação de total funcionalidade da Eudamed ter sido publicada, o "Resumo da Segurança e Desempenho" foi disponibilizado ao público mediante pedido por e-mail para emd.support@elitechgroup.com, em tempo útil.

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

Este produto contém reagentes produzidos pela Thermo Fisher Scientific e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Life Technologies Corporation. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department da Thermo Fisher Scientific, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

Os reagentes de deteção ELITe® MGB são abrangidos por um ou mais números de patente dos EUA 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e números de patente EP 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 bem como os pedidos que estejam atualmente pendentes.

Esta licença limitada permite à pessoa, ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, apenas para diagnóstico humano. Nem a ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

MDR/MTB ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Ref: RTS120ING



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «MDR/MTB ELITE MGB® Kit» is part of a qualitative nucleic acid amplification assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*) DNA and to identify the main mutations associated with resistance to Rifampicin and/or Isoniazid.

The product may be used for two different purposes:

- as an aid in the diagnosis of tuberculosis from *Mycobacterium tuberculosis* complex, in association with the patient's clinical data and other laboratory test results, in particular the culture methods for mycobacterium,
- as an aid in the diagnosis of tuberculosis and genotypic resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex, in association with the patient's clinical data and other laboratory test results, in particular phenotypic testing for antimicrobial susceptibility.

The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

Mix	Target	Gene	Fluorophore
TB1	MTB Complex	IS6110	FAM
	Rifampicin resistance	rpoB gene (rpoB2, rpoB3, rpoB4)	AP639; AP525; AP593
	Rifampicin resistance	rpoB gene (rpoB1)	AP639
TB2	Isoniazid resistance	katG	FAM
		inhA	AP593
TB1/TB2	Internal Control	Artificial sequence	AP680

C. Validated matrix

- › Sputum, bronchial aspirates (BA), bronchoalveolar lavages (BAL), urine, biopsies, cavity fluids and gastric aspirates previously liquefied, decontaminated and inactivated.

D. Kit content

TB1 PCR Mix	TB2 PCR Mix
Ready-to-use PCR Master Mix 4 tubes of 280 µL 7 freeze-thaw cycles per tube	Ready-to-use PCR master Mix 4 tubes of 280 µL 7 freeze-thaw cycles per tube
	
› 48 reactions per kit	› Storage Temperature: -20°C
	› Maximum shelf-life: 24 months

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| › ELITE InGenius instrument: INT030 | › MDR/MTB- ELITE Positive Control : CTR120ING |
| › ELITE InGenius SP 200 extraction cartridges: INT032SP200 | › CPE- Internal Control : CTCPE |
| › ELITE InGenius PCR Cassette amplification cartridges: INT035PCR | › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000 |
| › ELITE InGenius SP 200 Consumable Set consumables for extraction: INT032CS | › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S |

F. ELITE InGenius protocol

- | | | | |
|--|--------|------------------------------|---------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of qualitative result | CFU/mL |
| › Internal Control volume | 10 µL | | |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › PCR eluate input volume for each mix | 20 µL | | |
| › Q-PCR Mix volume for each mix | 20 µL | | |

G. Performance

Sample	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MTB Complex	Sputum	6 CFU/mL	100% 50/50*	98.1% 51/52*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Sputum	-	100% 55/55*	100% 47/47*
MTB Complex	BAL/BA	6 CFU/mL	91.3% 42/46*	97.5% 39/40*
Rifampicin and Isoniazid resistance	BAL/BA	-	100% 119/119*	100% 119/119*
MTB Complex	Urine	20 CFU/mL	80% 16/20*	100% 20/20*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Urine	-	100% 60/60*	100% 60/60*
MTB Complex	Biopsy	20 CFU/mL	90.5% 38/42*	100% 40/40*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Biopsy	-	100% 120/120*	100% 120/120*
MTB Complex	Cavitary Liquid	20 CFU/mL	97.5% 39/40*	100% 40/40*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Cavitary Liquid	-	100% 120/120*	100% 120/120*
MTB Complex	Gastric aspirates	20 CFU/mL	81.8% 18/22*	100% 20/20*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Gastric aspirates	-	100% 60/60*	100% 60/60*

*confirmed samples/ tested samples

H. Procedures

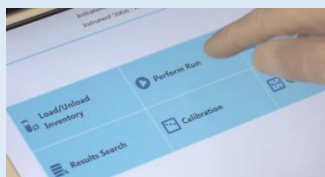
The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

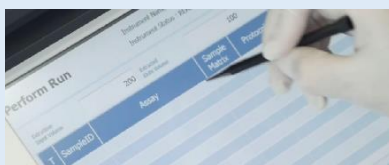
1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify controls: TB pos. and neg. controls in the "Control menu" NB: Both have been run, approved and not expired	3. Thaw TB1 and TB2 PCR Mixes and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
---	--	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen



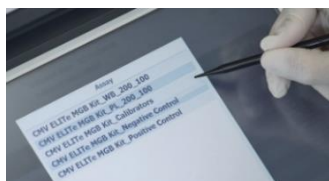
2. Verify the extraction volumes:
Input: "200 µL", eluate: "100 µL"



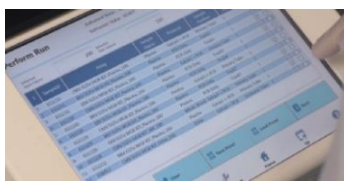
3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID



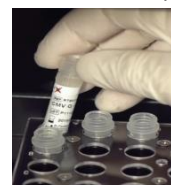
4. Select the "Assay protocol" of interest



5. Select the sample position:
"Extraction tube"



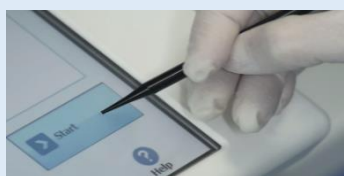
6. Load the PCR Mixes and the Internal Control in the inventory block



7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, Extraction tube racks



8. Close the door
Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

- 1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"

6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4

7. Load the PCR cassette rack
Load the PCR Mixes in the inventory block

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

- 1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Extraction tube

6. Load the Internal Control in the inventory block

7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction tube racks

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

**confirmed samples/ tested samples*