

cobas[®] **MTB**

Teste de ácidos nucleicos para utilização com os cobas[®] **6800/8800 Systems**

Para diagnóstico in vitro

cobas [®] MTB	P/N: 08412197190
cobas [®] MTB Positive Control Kit	P/N: 07544812190
cobas [®] 6800/8800 Buffer Negative Control Kit	P/N: 07002238190
cobas [®] Microbial Inactivation Solution (MIS)	P/N: 08185476001

Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação do teste	4
Reagentes e materiais	7
Reagentes e controlos do cobas® MTB	7
Reagentes cobas omni para preparação da amostra.....	9
cobas® Microbial Inactivation Solution.....	9
Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes	10
Materiais adicionais necessários.....	12
Equipamentos e software necessários.....	13
Precauções e requisitos de manuseamento.....	14
Advertências e precauções	14
Manuseamento de reagentes.....	15
Boas práticas de laboratório.....	15
Colheita, transporte e armazenamento de amostras.....	16
Amostras.....	16
Transporte e armazenamento de amostras.....	16
Armazenamento de amostras inativadas	16
Instruções de utilização	17
Notas de procedimento	17
Processamento de amostras de expetoração.....	20
Processamento de sedimentos de LBA e de expetoração.....	20
Processamento ultrassónico de amostras.....	21
Execução do cobas® MTB.....	22

Resultados	24
Controlo de qualidade e validação dos resultados	24
Interpretação dos resultados	24
Interpretação dos resultados	24
Limitações do procedimento	25
Avaliação do desempenho.....	27
Características principais de desempenho	27
Inativação de amostras.....	27
Limite de deteção (LoD)	27
Inclusividade	27
Precisão	28
Especificidade analítica/reactividade cruzada	29
Interferência	32
Falha global do sistema	33
Contaminação cruzada	33
Desempenho utilizando amostras clínicas	33
Informações adicionais	36
Características principais do teste.....	36
Símbolos	37
Fabricante e distribuidores.....	38
Marcas comerciais e patentes	38
Copyright.....	38
Bibliografia	39
Revisão do documento	40

Utilização prevista

O cobas® MTB para utilização nos cobas® 6800/8800 Systems é um teste automatizado, qualitativo, de diagnóstico *in vitro*, que utiliza reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, para a detecção direta do ADN do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) em esfregaços positivos ou esfregaços negativos para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em espécimes respiratórias humanas; incluindo expetoração e amostras de expetoração e de lavados brônquio-alveolares (LBA) digeridas e descontaminadas (tratadas com N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio [NALC-NaOH]).

Este teste é para utilização com amostras de pacientes que se suspeita estarem infetados com a *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e não estejam a tomar medicação antituberculosa. Este teste destina-se a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico da tuberculose pulmonar, em conjunto com resultados de culturas e outros resultados laboratoriais, assim como sintomas e sinais clínicos.

Resumo e explicação do teste

Fundamentos

A tuberculose é uma infeção bacterial causada por espécies do MTBC. A tuberculose é um problema grave de saúde à escala mundial, e é a causa principal de morte por doenças infecciosas no mundo inteiro.^{1,2} A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2017 à volta de 1,7 mil milhões de pessoas estavam infetadas com a MTB, com um número estimado de 10,0 milhões de novas infeções de tuberculose (TB) e 1,6 milhões de mortes.¹ Nestas estão incluídas aproximadamente 920 000 de infeções de TB em pessoas que vivem com HIV/SIDA (PQVCS), e 300 000 mortes nesta população.¹

O complexo *M. tuberculosis* compreende um grupo de espécies estreitamente relacionadas dentro do género da *Mycobacterium* que causa a doença em seres humanos e animais e inclui as *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guérin), *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. suricattae* e *M. orygis*. Embora a infeção com qualquer membro do complexo MTB possa causar a tuberculose, a *M. tuberculosis* é a causa mais comum. A doença pulmonar é a doença mais vulgarmente causada pelo complexo MTB. Pode ocorrer doença extrapulmonar, mas é relativamente mais prevalente em crianças. A *M. bovis* é a causa da tuberculose em até 2,8% dos pacientes no mundo inteiro.³ Os outros membros do complexo MTB sem ser a *M. bovis* e a *M. tuberculosis* são causas ainda menos comuns da doença nos seres humanos. A *M. africanum* tem sido associada à tuberculose em países da África Ocidental, a *M. canetti* no Nordeste Africano e a *M. orygis* causa a tuberculose nos seres humanos e animais desde a África à Ásia Meridional. A *M. caprae* é considerada uma subespécie da *M. bovis*. A *M. microti* causa a doença principalmente em roedores, a *M. pinnipedii* está associada à doença em focas e a *M. suricattae* causa a tuberculose nos suricates da África do Sul. A *M. mungi* foi identificada como uma causa da doença da tuberculose na família dos herpestidae (mangustos, etc.).⁴

A contaminação da tuberculose dá-se de pessoa para pessoa através de gotículas respiratórias. A maioria das pessoas que estão infetadas com a *M. tuberculosis* são assintomáticas e conseguem conter a doença a seguir à infeção primária. A isto chama-se infeção latente da tuberculose. As infeções latentes podem durar décadas e na maioria dos casos nunca se manifesta como doença clínica. Nalgumas pessoas, o microrganismo derrota as defesas imunitárias e provoca a evolução da infeção latente da tuberculose para a tuberculose ativa. Isto geralmente ocorre ou dentro dos 2 primeiros anos de infeção ou depois de longos períodos de latência. No total, existe um risco entre 5 e 10% para que doentes com a infeção latente venham a contrair a doença TB ativa; no entanto, o risco varia consoante muitos fatores, e pode ser substancialmente aumentado por imunossupressão como é o tratamento com “biológicos”⁵ (por ex., inibidores de TNF) e

infecção por HIV.^{6,7} Pessoas com TB pulmonar ativa podem produzir gotículas ao tossir, falar ou durante procedimentos médicos. As pessoas com doença pulmonar ativa são consideradas altamente infecciosas e conseqüentemente o diagnóstico é indispensável.

O diagnóstico da TB baseia-se em suspeitas e resultados clínicos, assim como em estudos radiográficos e laboratoriais. Poderá ser pedido aos pacientes para fornecerem amostras respiratórias para cultura ou para esfregaços de bactérias álcool-ácido resistentes, assim como para testes de amplificação de ácidos nucleicos. É indispensável que seja realizada cultura para além dos testes de amplificação de ácidos nucleicos, para ajudar a diminuir o risco de resultados falsos negativos, e para ajudar nos testes de suscetibilidade a fármacos para os pacientes que forem positivos.

O tratamento da tuberculose envolve a administração prolongada de vários fármacos e é geralmente efetivo. No entanto, o tratamento de estripes de MTB resistentes a um ou mais fármacos torna a cura mais difícil. O tratamento da TB multi resistente é complexo e exige a administração de vários fármacos tóxicos durante mais tempo do que com os pacientes de TB suscetíveis aos fármacos, com uma menor probabilidade de êxito do tratamento.⁸ O tratamento da tuberculose extensivamente resistente (TB XDR) está associada a piores resultados do que o da tuberculose multirresistente (TB MDR) e tem uma alta mortalidade entre pessoas infetadas com o HIV.¹

O diagnóstico de infeção por TB pode ser estabelecido com base em evidências clínicas, resultados laboratoriais e radiográficos, incluindo culturas e esfregaços de bactérias álcool-ácido resistentes e testes de amplificação de ácidos nucleicos. Adicionalmente, também podem ser utilizados ensaios que medem a resposta a anticorpos e antigénios (por ex., teste cutâneo da tuberculina, ensaio de liberação de interferon gama [INF γ] (IGRAs)).² No entanto, o teste cutâneo da tuberculina e os ensaios IGRA são muitas vezes negativos na doença ativa. O diagnóstico é confirmado pela recuperação do microrganismo em cultura ou pela deteção direta do ácido nucleico do complexo MTB numa amostra clínica. São necessários testes de suscetibilidade a fármacos (DST) para confirmar a terapia empírica apropriada, mas para isso é necessária a subcultura de isolados clínicos, e é um processo lento, sendo necessário aguardar semanas ou meses pelos resultados, consoante o método. Alternativamente, para resultados mais rápidos, os marcadores de resistência a fármacos podem ser detetados diretamente a partir de espécimes clínicos utilizando métodos moleculares. Dada a natureza infecciosa da MTB e a presença de resistência emergente, um diagnóstico rápido e preciso é um elemento importante do tratamento e controlo da MTB.²

Explicação do teste

O cobas® MTB para utilização nos cobas® 6800/8800 Systems (doravante no resto do presente documento referido como o cobas® MTB) é um teste PCR em tempo real, automatizado e qualitativo, concebido para detetar ADN do complexo MTB em esfregaços positivos ou esfregaços negativos para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em amostras respiratórias humanas; incluindo amostras de expetoração e sedimentos de LBA e de expetoração digeridos, descontaminados e tratados por NALC-NaOH. O controlo interno de ADN, utilizado para monitorizar todo o processo de preparação de amostras e amplificação por PCR nos cobas® 6800/8800 Systems, é introduzido em cada amostra durante o processamento. Adicionalmente, o teste utiliza um controlo positivo de título baixo e um controlo negativo.

Princípios do procedimento

O **cobas**® MTB baseia-se na liquefação pré-analítica da amostra e na inativação de micobactérias, seguida do processamento ultrassónico da amostra e da preparação totalmente automática da amostra (extração e purificação dos ácidos nucleicos) amplificação por PCR e deteção. A liquefação da amostra e a inativação de micobactérias ocorrem simultaneamente durante a incubação da amostra com **cobas**® Microbial Inactivation Solution (MIS) (Solução de inativação microbiana). O processamento ultrassónico da amostra liquefeita e inativada é efetuada antes do carregamento nos **cobas**® 6800/8800 Systems. Os **cobas**® 6800/8800 Systems são constituídos pelo módulo de abastecimento de amostras, o módulo de transferência, o módulo de processamento e o módulo analítico. A gestão automática de dados é executada pelo software **cobas**® 6800/8800, que classifica os resultados de teste como positivos, negativos ou inválidos. Os resultados podem ser examinados diretamente no ecrã do sistema ou impressos como um relatório.

Ácidos nucleicos de amostras de pacientes, controlos externos e moléculas adicionadas de ADN do controlo interno (DNA-IC) são extraídos simultaneamente. Em resumo, o ácido nucleico bacterial é libertado por rutura química (**cobas**® Microbial Inactivation Solution [MIS], **cobas** **omni** Lysis Reagent), enzimática (proteínase) e física (processamento ultrassónico) das bactérias. Os ácidos nucleicos libertados ligam-se à superfície de sílica das partículas de vidro magnéticas adicionadas. As substâncias não ligadas e impurezas, tais como proteínas desnaturadas, detritos celulares e potenciais inibidores da PCR, são removidas com os posteriores passos de lavagem, e os ácidos nucleicos purificados são eluídos das partículas de vidro magnéticas, com tampão de eluição, a elevada temperatura.

A amplificação seletiva dos ácidos nucleicos alvo da amostra é conseguida através da utilização de primers senso e anti-senso específicos do alvo do complexo MTB, que são selecionados de regiões altamente conservadas dentro do respetivo organismo alvo. A MTB é detetada por dois conjuntos seletivos de primers e duas sondas que têm como alvo regiões separadas (duplo alvo, gene 16S rRNA e genes *esx*, *esxJ*, *esxK*, *esxM*, *esxP* e *esxW*). A amplificação seletiva do DNA-IC é conseguida através da utilização de primers senso e anti-senso específicos da sequência, que são selecionados para que não tenham qualquer homologia com as regiões alvo do complexo MTB. É utilizada uma enzima polimerase do ADN termoestável para a amplificação por PCR. As sequências do alvo e do DNA-IC são amplificadas simultaneamente utilizando um perfil universal para amplificação por PCR com passos e número de ciclos de temperatura predefinidos. A mistura principal inclui trifosfato de desoxiuridina (dUTP), em vez de trifosfato de desoxitimidina (dTTP), que é incorporado no ADN acabado de sintetizar (amplicon). Quaisquer amplicons contaminantes de corridas de PCR anteriores são eliminados durante o primeiro ciclo térmico pela enzima AmpErase, que é incluída na mistura principal da PCR.⁹ No entanto, os amplicons acabados de formar não são eliminados, uma vez que a enzima AmpErase fica inativada quando exposta a temperaturas acima dos 55 °C.

A mistura principal do **cobas**® MTB contém duas sondas de deteção específicas das sequências alvo do complexo MTB e uma para o DNA-IC. As sondas específicas do alvo estão marcadas com diferentes corantes sinalizadores fluorescentes que permitem a deteção simultânea de alvo de complexo MTB e de DNA-IC em dois canais diferentes.^{10,11} Quando não ligado à sequência alvo, o sinal fluorescente das sondas intactas é suprimido por um corante de supressão. Durante o passo de amplificação por PCR, a hibridização das sondas com o ADN de cadeia simples específica, resulta em clivagem da sonda pela atividade da exonuclease 5' a 3' da polimerase do ADN, causando a separação dos corantes de sinalização e de supressão e a geração de um sinal fluorescente. Com cada ciclo da PCR, são geradas quantidades crescentes de sondas clivadas e o sinal cumulativo do corante sinalizador aumenta concomitantemente. A deteção e a discriminação em tempo real dos produtos da PCR são conseguidas medindo a fluorescência dos corantes sinalizadores libertados, para os alvos de complexo MTB e o DNA-IC, respetivamente.

Reagentes e materiais

Reagentes e controlos do cobas® MTB

Todos os reagentes e controlos não abertos têm de ser armazenados conforme recomendado na Tabela 1 até à Tabela 5.

Tabela 1 cobas® MTB

cobas® MTB		
Conservar entre 2 e 8 °C Cassete de 384 testes (P/N 08412197190)		
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit
Solução de proteinase (PASE)	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, 8% de proteinase EUH210: Ficha de segurança fornecida a pedido. EUH208: Contém subtilisina. Pode desencadear uma reação alérgica.	38 ml
Controlo Interno de ADN (DNA-IC)	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de estrutura de ADN sem relacionamento a MTB, 0,002% de ARN de Poli rA (sintético), < 0,1% de azida de sódio	38 ml
Tampão de Eluição (EB)	Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	38 ml
Reagente 1 da Mistura Principal (MMX-R1)	Acetato de manganês, hidróxido de potássio, < 0,1% de azida sódica	14,5 ml
Reagente 2 da Mistura Principal de MTB (MTB MMX-R2)	Tampão de tricina, acetato de potássio, EDTA, glicerol, < 18% de sulfóxido de dimetilo, < 0,12% de dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,1% de Tween 20, < 0,1% de azida de sódio, < 0,1% de polimerase do ADN Z05, < 0,1% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana), < 0,01% de primers senso e anti-senso de controlo interno, < 0,01% de primers de MTB a jusante e a montante, < 0,01% de sondas de oligonucleótido marcadas com fluorescência específicas do complexo MTB e do controlo interno de ADN, < 0,01% de aptâmero oligonucleotídico	17,5 ml

Tabela 2 cobas® MTB Positive Control Kit

cobas® MTB Positive Control Kit		
Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 07544812190)		
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit
Controlo Positivo de MTB (MTB (+) C)	Tampão Tris, < 0,05% de azida de sódio, < 0,05% de EDTA, < 0,002% de Poly rA, < 0,01% de ADN de plasmídeo não infeccioso (de origem microbiana) contendo sequência genómica <i>M. tuberculosis</i> .	16 ml (16 x 1 ml)

Tabela 3 cobas® 6800/8800 Buffer Negative Control Kit**cobas® 6800/8800 Buffer Negative Control Kit**

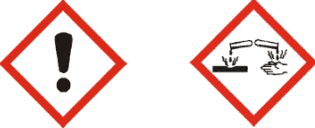
Conservar entre 2 e 8 °C

(P/N 07002238190)

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit
cobas® 6800/8800 Buffer Negative Control (BUF (-) C)	Tampão Tris, < 0,1% de azida de sódio, EDTA, < 0,002% de ARN de Poli-rA (sintético)	16 ml (16 x 1 ml)

Reagentes cobas omni para preparação da amostra

Tabela 4 Reagentes cobas omni para preparação da amostra*

Reagentes	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997546190)	Partículas de vidro magnéticas, Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	480 testes	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997511190)	Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	4 × 875 ml	Não aplicável
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997538190)	43% (p/p) de tiocianato de guanidina***, 5% (p/v) de polidocanol***, 2% (p/v) de ditiotretol***, citrato de sódio dihidratado	4 × 875 ml	 <p>PERIGO</p> <p>H302 + H332: Nocivo por ingestão e por inalação. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P273: Evitar a libertação para o ambiente. P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. P303 + P361 + P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água. P304 + P340 + P310: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P305 + P351 + P338 + P310: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol</p>
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservar entre 15 e 30 °C (P/N 06997503190)	Citrato de sódio dihidratado, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo	4,2 l	Não aplicável

* Estes reagentes não estão incluídos no kit cobas® MTB. Consulte a lista dos materiais adicionais necessários (Tabela 10).

** A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE.


*** Substância perigosa.

cobas® Microbial Inactivation Solution

Tabela 5 cobas® Microbial Inactivation Solution*

cobas® Microbial Inactivation Solution

Conservar entre 2 e 8 °C
(P/N 08185476001)

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade e por kit	Símbolo e advertência de segurança**
cobas® Microbial Inactivation Solution (MIS)	Tampão Tris, 60% (v/v) de isopropanol***, 1% (p/v) de Timol***, 18,9% (p/v) de tiocianato de guanidina***, 1,4% (p/v) de cloridrato de fosfina Tris [2-carboxietil]***, 0,4% (p/v) de Tween 20	480 ml (16 x 30 ml)	 <p>PERIGO</p> <p>H225: Líquido e vapor facilmente inflamáveis. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H336: Pode provocar sonolência ou vertigens. H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. P210: Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar. P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P303 + P361 + P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água. P304 + P340 + P310: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P305 + P351 + P338 + P310: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P370 + P378: Em caso de incêndio: para extinguir, utilizar areia seca, pó químico ou espuma resistente a álcool. 67-63-0 Propano-2-ol 593-84-0 Tiocianato de guanidina 51805-45-9 Tris [2-carboxietil] fosfina, cloridrato 89-83-8 Timol</p>

* Este reagente não está incluído no kit cobas® MTB.

** A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE.

*** Substância perigosa.

Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes

Os reagentes deverão ser armazenados e manuseados conforme especificado na Tabela 6 e Tabela 7.

Quando os reagentes não estiverem nos cobas® 6800/8800 Systems, armazene-os à temperatura correspondente especificada na Tabela 6.

Tabela 6 Armazenamento de reagentes (quando o reagente não se encontra no sistema)

Reagente	Temperatura de armazenamento
cobas® MTB	2 a 8 °C
cobas® MTB Positive Control Kit	2 a 8 °C
cobas® Buffer Negative Control Kit	2 a 8 °C
cobas omni Lysis Reagent	2 a 8 °C
cobas omni MGP Reagent	2 a 8 °C
cobas omni Specimen Diluent	2 a 8 °C
cobas omni Wash Reagent	15 a 30 °C (temperatura ambiente)

Uma vez colocados nos cobas® 6800/8800 Systems, os reagentes são armazenados automaticamente a temperaturas apropriadas e os respetivos prazos de validade são controlados pelo sistema. Os cobas® 6800/8800 Systems apenas permitem que os reagentes sejam usados se as condições indicadas na Tabela 7 forem satisfeitas. O sistema impede a utilização de reagentes expirados, de forma automática. A Tabela 7 permite ao utilizador compreender as condições de manuseamento de reagentes impostas pelos cobas® 6800/8800 Systems.

Tabela 7 Condições de manuseamento de reagentes impostas pelos cobas® 6800/8800 Systems

Reagente	Estabilidade do kit aberto	Número de corridas para as quais este kit pode ser usado	Estabilidade a bordo do equipamento (tempo acumulado a bordo do equipamento fora do frigorífico)
cobas® MTB	90 dias desde a primeira utilização	Máx. 40 corridas	Máx. 40 horas
cobas® MTB Positive Control Kit	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas® Buffer Negative Control Kit	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas omni Lysis Reagent	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni MGP Reagent	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Wash Reagent	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável

* O tempo é medido a partir da primeira vez que o reagente é carregado nos cobas® 6800/8800 Systems.

Armazene a MIS à temperatura especificada na Tabela 8.

Tabela 8 Armazenamento da **cobas**® Microbial Inactivation Solution

Reagente	Temperatura de armazenamento
MIS	2 a 8 °C

Se não for aberta, a MIS mantém-se estável até ao fim do prazo de validade indicado. Uma vez aberto, este reagente mantém-se estável durante 30 dias quando armazenado entre 2 e 8 °C, incluindo 5 horas acumuladas entre 15 e 30 °C ou até ao fim do prazo de validade, o que ocorrer primeiro, conforme especificado na Tabela 9.

Tabela 9 Condições de validade da **cobas**® Microbial Inactivation Solution

Reagente	Prazo de validade do kit	Estabilidade do kit aberto	Número de corridas para as quais este kit pode ser usado	Estabilidade entre 15 e 30 °C (temperatura ambiente)
MIS	Data não ultrapassada	30 dias desde a primeira utilização	Não aplicável	Máx. 5 horas

Materiais adicionais necessários

Tabela 10 Material e consumíveis para utilizar nos **cobas**® 6800/8800 Systems

Material	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Saco de resíduos sólidos e Reservatório de resíduos sólidos ou Saco de resíduos sólidos com fundo rígido e Kit modificado para a gaveta de resíduos sólidos	07435967001 e 07094361001 ou 08030073001 e 08387281001
MPA RACK 13 MM LIGHT GREEN 7001-7050*	03118878001 ou equivalente

* Para utilizar o **cobas**® MTB são necessárias racks MPA de 13 mm. Contacte o representante local da Roche para uma lista detalhada de racks de amostras, racks de pontas obstruídas e suportes de racks aceites nos equipamentos.

Tabela 11 Outros materiais e consumíveis necessários para o fluxo de trabalho pré-analítico**Materiais**

Dispositivo de processamento ultrassônico de tubos TS 5 (Rinco Ultrasonics AG - P/N 46690)

Tubos de 75 x 13 mm de polipropileno esterilizados de 5 ml, com tampas de enroscar e base redonda (Sarstedt - P/N do tubo 60.504.010, P/N da tampa de enroscar 65.163)*

MPA RACK 13 MM LIGHT GREEN 7001-7050 (P/N Roche 03118878001 ou equivalente)**

Centrífuga (opção para restringir RCF para um máx. de 3000 x g, compatível com tubos com tampa de enroscar de 75 x 13 mm)

Misturador de agitação forte

Etiquetas de código de barras termoestáveis (OPAL Associates AG, P/N 20300824 TTR PE-Folie Pharma ou equivalente)***

* A utilização de tubos que não sejam os recomendados acima, tem de ser verificada pelo utilizador antes da implementação do fluxo de trabalho do **cobas**® MTB no laboratório.

** São necessárias racks MPA de 13 mm para utilizar o dispositivo de processamento ultrassônico de tubos TS 5. Para uma lista de encomendas detalhada de racks de amostras equivalentes noutras cores ou intervalos de números, contacte o representante local da Roche. Tenha em atenção que as racks RD5 não são compatíveis com o dispositivo de processamento ultrassônico de tubos TS 5.

*** Para mais detalhes sobre as especificações dos códigos de barras, consulte o Guia do utilizador dos **cobas**® 6800/8800 Systems. A utilização de etiquetas de código de barras que não sejam as recomendados acima, tem de ser verificada pelo utilizador antes da implementação do fluxo de trabalho do **cobas**® MTB no laboratório. Contacte o representante local da Roche para obter mais detalhes sobre etiquetas de códigos de barras compatíveis e sugestões de verificação de compatibilidade. A utilização de etiquetas de códigos de barras não compatíveis pode provocar danos nos tubos durante o processamento ultrassônico e consequente contaminação do equipamento.

Equipamentos e software necessários

O software **cobas**® 6800/8800 e o pacote de análise **cobas**® MTB deverão ser instalados no(s) equipamento(s).

O servidor IG (Instrument Gateway) será fornecido com o sistema.

Tabela 12 Equipamentos

Equipamento	P/N
cobas ® 6800 System (Plataforma móvel)	05524245001 e 06379672001
cobas ® 6800 System (Plataforma fixa)	05524245001 e 06379664001
cobas ® 8800 System	05412722001
Módulo de abastecimento de amostras	06301037001
Gateway do equipamento	06349595001

Precauções e requisitos de manuseamento

Advertências e precauções

À semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, boas práticas de laboratório são essenciais para um desempenho adequado deste teste. Em virtude da elevada sensibilidade deste teste, deverão ser tomadas as devidas precauções para manter os reagentes e as misturas de amplificação livres de contaminação.

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Todas as amostras de paciente devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Por conseguinte, todas as amostras biológicas devem ser manuseadas como se estivessem infetadas, utilizando boas práticas de laboratório, conforme descrito em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, no Documento M29-A4 do CLSI e no Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual da OMS.^{12,13,14} Este procedimento só deve ser efetuado por pessoal com experiência no manuseamento de materiais infecciosos e na utilização do **cobas®** MTB e dos **cobas®** 6800/8800 Systems.
- Todo o pessoal deve usar equipamento de proteção pessoal, incluindo batas de laboratório, luvas descartáveis e proteção respiratória e para os olhos, de acordo com as práticas e procedimentos de segurança das respetivas instituições e deverão seguir os procedimentos de segurança da sua instituição relativamente a trabalhar com químicos e amostras biológicas.
- A inativação de amostras pela MIS deve ser executada numa cabine de biossegurança (CBS; Tipo A2) dentro de um laboratório com um nível de segurança biológica 3¹², ou outro ambiente com controlo de biossegurança de acordo com as diretrizes ou regulamentos locais ou institucionais.
- O êxito da inativação da TB depende do cumprimento dos procedimentos descritos no presente documento e da mistura completa da amostra com a MIS. O tratamento pré-analítico de amostras de paciente com a MIS reduz, mas não elimina completamente, o risco de infeção por TB.
- Se ocorrer derrame de amostras com MIS (que contém tiocianato de guanidínio), não deixe que entre em contacto com desinfetantes que contêm hipoclorito de sódio, como a lixívia. Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- A MIS é sensível à luz e é fornecida em frascos com proteção contra a luz. A MIS deve ser armazenada verticalmente.
- Para garantir o desempenho estabelecido do teste, utilize apenas os materiais consumíveis fornecidos ou especificados.
- Para garantir que o teste é executado corretamente, siga rigorosamente os procedimentos e diretrizes fornecidos. Qualquer desvio dos procedimentos e diretrizes poderá afetar o desempenho estabelecido do teste.
- Poderão ocorrer resultados falsos positivos se durante a manipulação e processamento das amostras, o carryover das amostras não for controlado adequadamente.
- Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.

Manuseamento de reagentes

- Para evitar carryover de amostras, reagentes ou controlos, manipule todos os reagentes, controlos e amostras de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Inspeccione visualmente todas as cassetes de reagente, diluentes, reagente de lise e reagente de lavagem, antes dos mesmos serem utilizados, para se certificar de que não existem quaisquer sinais de fugas. Se existir algum indício de fuga, não utilize esse material para testes.
- O **cobas omni** Lysis Reagent e a MIS contêm tiocianato de guanidínio, um produto químico potencialmente perigoso. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras.
- Não permita que o **cobas omni** Lysis Reagent ou a MIS, que contêm tiocianato de guanidínio, entre em contacto com solução de hipoclorito de sódio (lixívia). Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- Os kits de controlo depois de usados contêm frascos perfurados com reagente residual; deve-se ter o máximo cuidado para evitar derrames e o contacto.
- O kit **cobas**® MTB, o **cobas**® MTB Positive Control Kit, o **cobas**® Buffer Negative Control Kit, o **cobas omni** MGP Reagent e o **cobas omni** Specimen Diluent contêm azida de sódio como conservante. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras. No caso de derrame destes reagentes, dilua com água antes de passar com um pano para secar.
- Elimine todos os materiais que tenham entrado em contacto com amostras e reagentes, de acordo com regulamentações nacionais, estaduais e locais.

Boas práticas de laboratório

- Não efetue pipetagem com a boca.
- Não coma, não beba nem fume nas áreas de trabalho.
- A inativação de amostras pela MIS deve ser executada numa cabine de biossegurança (CBS; Tipo A2) dentro de um laboratório com um nível de segurança biológica 3¹², ou outro ambiente com controlo de biossegurança de acordo com as diretrizes ou regulamentos locais ou institucionais.
- Use luvas de laboratório, bata de laboratório e proteção ocular e respiratória quando manusear amostras e reagentes de acordo com as diretrizes institucionais. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras e controlos. Para evitar contaminação, as luvas têm de ser trocadas entre o manuseamento de amostras e o manuseamento do kit **cobas**® MTB, **cobas**® MTB Positive Control kit, **cobas**® 6800/8800 Buffer Negative Control kit e reagentes **cobas omni**.
- Desinfete e lave muito bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes, e depois de retirar as luvas.
- Limpe e desinfete cuidadosamente todas as superfícies de trabalho do laboratório com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada (diluir lixívia doméstica a 1:10). A seguir esfregue a superfície com um pano com etanol a 70%.
- Se ocorrer algum derrame ou salpicos nos **cobas**® 6800/8800 Systems, siga as instruções no Guia do utilizador dos **cobas**® 6800/8800 Systems para limpar e descontaminar adequadamente a superfície do(s) equipamento(s).

Colheita, transporte e armazenamento de amostras

Nota: Manuseie todas as amostras e controlos tendo em conta a possibilidade de transmitirem agentes infecciosos.

Amostras

Pode ser utilizado com o cobas® MTB expetoração e sedimentos de LBA e de expetoração tratados com NALC-NaOH.

Transporte e armazenamento de amostras

As amostras de expetoração sem preparação podem ser transportadas e/ou armazenadas durante até 3 dias entre 2 °C e 35 °C, seguido de até 7 dias entre 2 °C e 8 °C, antes da liquefação e inativação das amostras pela MIS. No caso de armazenamento de longo prazo de amostras de expetoração não tratadas com MIS, recomenda-se temperaturas ≤ -20 °C.

Os sedimentos de LBA e de expetoração tratados com NALC-NaOH poderão ser armazenados durante até 7 dias entre 2 °C e 8 °C antes da inativação da amostra pela MIS. No caso de armazenamento de longo prazo de sedimentos de LBA e de expetoração não tratados com MIS, as amostras podem ser armazenadas congeladas a temperaturas ≤ -20 °C durante até 9 meses, incluindo 2 ciclos de congelação/descongelação.

Caso seja necessário expedir amostras, estas devem ser embaladas e rotuladas em conformidade com os regulamentos locais e/ou internacionais aplicáveis ao transporte de amostras infecciosas e agentes etiológicos.

Armazenamento de amostras inativadas

As amostras de expetoração e de sedimentos de LBA e de expetoração tratados com NALC-NaOH, que forem tratadas com MIS (inativadas), podem ser armazenadas durante até 12 horas entre 15 °C e 35 °C, seguido de até 7 dias entre 2 °C e 8 °C e 30 dias a ≤ -20 °C incluindo 2 ciclos de congelação/descongelação antes do processamento nos cobas® 6800/8800 Systems.

Nota: amostras tratadas com MIS poderão não congelar devido a alto conteúdo de isopropanol.

Nota: o processamento ultrassónico das amostras poderá ser executado em qualquer altura após a incubação inicial com MIS durante um mínimo de 60 minutos. Para mais detalhes, consulte a secção “Processamento ultrassónico de amostras”.

Instruções de utilização

Notas de procedimento

- Não utilize **cobas**® MTB, **cobas**® MTB Positive Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit, MIS ou reagentes **cobas** **omni** depois de expirados os respetivos prazos de validade.
- Não reutilize consumíveis. Os consumíveis são para uma única utilização.
- Certifique-se de que as etiquetas de código de barras termoestáveis dos tubos de amostra estão viradas para a frente e são visíveis através das aberturas superiores e laterais das racks de amostras MPA. Para as especificações corretas dos códigos de barras e informações adicionais sobre o carregamento de tubos de amostra, consulte a Figura 1 e o Guia do utilizador dos **cobas**® 6800/8800 Systems.
- Certifique-se de que são retiradas as tampas aos tubos de amostra após o processamento por ultrassons e antes do carregamento nos **cobas**® 6800/8800 Systems.
- Para a manutenção adequada dos equipamentos, consulte o Guia do Utilizador dos **cobas**® 6800/8800 Systems.

Antes da utilização do **cobas**® MTB nos **cobas**® 6800/8800 Systems, as amostras devem ser processadas de acordo com as seguintes secções: “Processamento de amostras de expetoração” ou “Processamento de sedimentos de LBA e de expetoração” e “Processamento ultrassónico de amostras”. Fluxos de trabalho representativos abreviados estão resumidos na Tabela 13 para o tipo de amostra de expetoração e na Tabela 14 para o tipo de amostra de sedimento. Para mais detalhes, consulte as secções subsequentes.

Nota: a inativação de amostras pela MIS deve ser executada numa cabine de biossegurança (CBS; Tipo A2) dentro de um laboratório com um nível de biossegurança 3¹², ou sob outras medidas de biossegurança de acordo com as diretrizes ou regulamentos locais ou institucionais.

Nota: o processamento ultrassónico de amostras tratadas com MIS pode ser executado num laboratório com nível de biossegurança NBS-2 ou outro ambiente com controlo de biossegurança de acordo com as diretrizes ou regulamentos locais ou institucionais.

Tabela 13 Panorâmica de fluxo de trabalho - Tipo de amostra de expetoração




















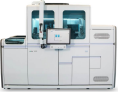
NBS-3 (CBS de Tipo A2)	1				Adicione 2 partes de MIS a 1 parte de expetoração
	2		30 a 60 segundos		Misture com agitação forte durante 30 a 60 segundos
	3		≥ 60 minutos		Incube a amostra durante pelo menos 60 min. entre 15 e 30 °C (temperatura ambiente)
	4		30 a 60 segundos		Misture com agitação forte durante 30 a 60 segundos
	5		1,2 ml para 1 teste 2,4 ml para 2 testes 3,6 ml para 3 testes		Transfira entre 1,2 e 3,6 ml de amostra tratada com MIS para um tubo secundário com tampa de enroscar
NBS-2	6		5 minutos		Processe com ultrassons a amostra tratada com MIS
	7		Máximo 1 minuto		Centrifugue a amostra durante um máximo de 1 minuto a um máximo RCF de 3000 x g
	8				Carregue a amostra sem tampa nos cobas® 6800/8800 Systems e inicie a corrida com o tipo de amostra de expetoração

Tabela 14 Panorâmica de fluxo de trabalho - Tipo de amostra de sedimento

NBS-3 (CBS de Tipo A2)	1		0,2 ml para 1 teste 0,4 ml para 2 testes 0,6 ml para 3 testes	Misture com agitação forte e transfira entre 0,2 e 0,6 ml de amostra de sedimento para um tubo secundário com tampa de enroscar
	2	  		Adicione 5 partes de MIS a 1 parte de amostra de sedimento <ul style="list-style-type: none"> • 1 ml de MIS para 1 teste (0,2 ml de amostra de sedimento) • 2 ml de MIS para 2 testes (0,4 ml de amostra de sedimento) • 3 ml de MIS para 3 testes (0,6 ml de amostra de sedimento)
	3		30 a 60 segundos	Misture com agitação forte durante 30 a 60 segundos
	4		≥ 60 minutos	Incube a amostra durante pelo menos 60 min. entre 15 e 30 °C (temperatura ambiente)
	5		30 a 60 segundos	Misture com agitação forte durante 30 a 60 segundos
NBS-2	6		5 minutos	Processe com ultrassons a amostra tratada com MIS
	7		Máximo 1 minuto	Centrifugue a amostra durante um máximo de 1 minuto a um máximo RCF de 3000 x g
	8			Carregue a amostra sem tampa nos cobas ® 6800/8800 Systems e inicie a corrida com o tipo de amostra de sedimento

Processamento de amostras de expetoração

- Confirme que o recipiente com a expetoração está devidamente etiquetado e contém um mínimo de 0,4 ml de expetoração. Se armazenada congelada, descongele a amostra e deixe-a alcançar a temperatura ambiente.
- Inverta os frascos de MIS duas a quatro vezes antes de usar.
- Abra o recipiente com a expetoração e adicione aproximadamente 2 partes de MIS a 1 parte de amostra de expetoração (por ex., 2 ml de MIS para 1 ml de amostra de expetoração) por estimativa visual do volume e utilizando uma pipeta descartável. Feche firmemente o recipiente com a expetoração.
- Feche os frascos de MIS imediatamente após terem sido usados.
- Misture com agitação forte durante 30 a 60 segundos.

Nota: certifique-se de que toda a amostra de expetoração é misturada com a MIS.

- Incube a amostra durante pelo menos 60 minutos entre 15 e 30 °C (temperatura ambiente).

Nota: consulte a secção “Armazenamento de amostras inativadas” para as condições de armazenamento máximo.

- Misture com agitação forte durante 30 a 60 segundos ou até a amostra ficar totalmente homogeneizada.
- Transfira entre um mínimo de 1,2 ml e um máximo de 3,6 ml de amostra de expetoração tratada com MIS para um tubo de 5 ml de polipropileno de base redonda e de 75 x 13 mm, com tampa de enroscar e etiqueta de código de barras termoestável (Sarstedt - P/N do tubo 60.504.010, P/N da tampa 65.163). Feche firmemente o tubo.

Nota: antes de transferir a amostra, confirme que as informações no código de barras do recipiente com a expetoração correspondem ao do tubo secundário de 5 ml.

Nota: Consulte a Tabela 15.

- Processe com ultrassons a amostra inativada de acordo com a secção “Processamento ultrassónico de amostras” antes de executar o cobas® MTB.

Processamento de sedimentos de LBA e de expetoração

- Confirme que o recipiente com sedimentos de LBA e de expetoração tratados com NALC-NaOH está devidamente etiquetado e contém um mínimo de 0,2 ml de amostra. Se armazenada congelada, descongele a amostra e deixe-a alcançar a temperatura ambiente.
- Misture a amostra de sedimento com agitação forte durante um mínimo de 10 segundos.
- Transfira entre um mínimo de 0,2 ml e um máximo de 0,6 ml de amostra de sedimento para um tubo de 5 ml de polipropileno de base redonda e de 75 x 13 mm, com tampa de enroscar e etiqueta de código de barras (Sarstedt - P/N do tubo 60.504.010, P/N da tampa 65.163).

Nota: antes de transferir a amostra, confirme que as informações no código de barras do recipiente com a amostra correspondem ao do tubo secundário de 5 ml.

- Inverta os frascos de MIS duas a quatro vezes antes de usar.
- Adicione 5 partes de MIS a 1 parte de amostra (por ex., 1 ml de MIS para 0,2 ml de amostra). Feche o tubo firmemente.

Nota: Consulte a Tabela 15.

- Feche os frascos de MIS imediatamente após terem sido usados.
- Misture com agitação forte durante 30 a 60 segundos.

Nota: certifique-se de que toda a amostra é misturada com a MIS.

- Incube a amostra durante pelo menos 60 minutos entre 15 e 30 °C (temperatura ambiente).

Nota: consulte a secção “Armazenamento de amostras inativadas” para as condições de armazenamento máximo.

- Misture com agitação forte durante 30 a 60 segundos.
- Processe com ultrassons a amostra inativada de acordo com a secção “Processamento ultrassónico de amostras” antes de executar o cobas® MTB.

Tabela 15 Requisitos de volume de amostra tratada com cobas® Microbial Inactivation Solution para executar o cobas® MTB

Número de testes a executar a partir do tubo secundário	Volume mínimo necessário de amostra tratada com MIS	Volume máximo permitido de amostra tratada com MIS
1 pedido de teste	1,2 ml	3,6 ml
2 pedidos de teste*	2,4 ml	3,6 ml
3 pedidos de teste*	3,6 ml	3,6 ml

* Podem ser utilizados para processamento de batches mistos com outros ensaios cobas® 6800/8800 utilizando o mesmo tipo de amostra ou para repetição de testes.

Processamento ultrassónico de amostras

- O processamento ultrassónico de amostras para execução do cobas® MTB tem de ser efetuado utilizando um dispositivo de processamento ultrassónico de tubos TS 5 da Rinco Ultrasonics AG (P/N 46690). A utilização de outro dispositivo de processamento ultrassónico poderá dar origem a resultados falsos positivos, falsos negativos e/ou inválidos. A operação do equipamento está descrita detalhadamente no Guia do utilizador do fabricante.
- Numa rack MPA, coloque os 5 tubos de tampa de enroscar fechados e com etiqueta de código de barras, contendo entre 1,2 ml e 3,6 ml de amostra tratada com MIS.

Nota: certifique-se de que as etiquetas de código de barras termoestáveis dos tubos de amostra estão viradas para a frente e são visíveis através das aberturas superiores e laterais das racks de amostras MPA (veja a Figura 1).

Nota: certifique-se de que cada tubo contém uma etiqueta de código de barras.

Nota: certifique-se de que todas as cinco posições de tubo da rack MPA estão ocupadas. Se estiverem disponíveis menos do que 5 tubos com amostras tratadas com MIS, as restantes posições da rack devem ser ocupadas com tubos “fictícios” do mesmo tipo de tubo, cheios de água ou de MIS e com uma etiqueta de código de barras.

Figura 1 Colocação correta de tubos de amostra na rack MPA antes do processamento ultrassônico



- Inicie o dispositivo de processamento ultrassônico de tubos.
- Selecione o perfil predefinido de processamento ultrassônico “Amostras respiratórias”.
- Abra o dispositivo de processamento ultrassônico de tubos e insira a rack MPA de acordo com as instruções do fabricante.
- Feche o dispositivo de processamento ultrassônico de tubos.
- Inicie a corrida de processamento ultrassônico.
- Confirme que a corrida de processamento ultrassônico foi bem sucedida e retire a rack MPA.
 - Nota:* prevê-se que os tubos de amostra aqueçam durante a corrida de processamento ultrassônico. Tenha cuidado quando retirar a rack MPA com os tubos de amostra.
 - Nota:* em caso de falha do processamento ultrassônico, consulte as instruções do fabricante, corrija a causa e repita a corrida de processamento ultrassônico, depois de deixar as amostras arrefecer durante pelo menos 15 minutos.
- As amostras tratadas com MIS e processadas com ultrassons podem agora ser executadas com o **cobas®** MTB ou podem ser armazenadas de acordo com a secção “Armazenamento de amostras inativadas”.

Execução do cobas® MTB

O **cobas®** MTB pode ser executado com um volume mínimo de amostra de 1,2 ml. A operação do equipamento é descrita detalhadamente na Assistência ao utilizador ou no Guia do utilizador dos **cobas®** 6800/8800 Systems. A Figura 2 a seguir resume o procedimento.

Antes de retirar a tampa aos tubos para introduzir as amostras nos **cobas®** 6800/8800 Systems, recomenda-se sedimentar os detritos celulares e de matriz por centrifugação da amostra durante um máximo de 1 minuto a um RCF máximo de 3000 x g.

Nota: misture as amostras com agitação forte durante um mínimo de 10 segundos se as amostras tiverem estado armazenadas durante mais de 1 hora depois do processamento ultrassônico e antes da centrifugação.

Nota: a omissão do passo de centrifugação poderá causar um aumento da taxa de coágulos de amostra nos **cobas®** 6800/8800 Systems.

Figura 2 Procedimento do cobas® MTB

1	<p>Iniciar sessão no sistema Prima Start (Iniciar) para preparar o sistema Pedir testes</p> <ul style="list-style-type: none">• Selecionar “Raw sputum” (Expetoração) para pedir amostras de expetoração tratadas com MIS• Selecionar “Sediment” (Sedimento) para pedir amostras de sedimentos de LBA/expetoração tratadas com MIS
2	<p>Reabastecer reagentes e consumíveis conforme solicitado pelo sistema</p> <ul style="list-style-type: none">• Colocar a cassete de reagente específica do teste• Colocar cassetes de controlo• Carregar pontas de pipetagem• Carregar placas de processamento• Colocar reagente MGP• Carregar placas de amplificação• Reabastecer diluente de amostras• Reabastecer reagente de lise• Reabastecer reagente de lavagem
3	<p>Colocar amostras no sistema</p> <ul style="list-style-type: none">• Para cada amostra<ul style="list-style-type: none">○ Retirar a tampa do tubo○ Colocar o tubo na rack.• Colocar a rack de amostras e as racks de pontas obstruídas no módulo de abastecimento de amostras.• Confirmar que as amostras foram aceites no módulo de transferência.
4	<p>Iniciar a corrida</p>
5	<p>Examinar e exportar os resultados</p>
6	<p>Retirar e colocar a tampa nos tubos de amostra que cumprem os requisitos mínimos de volume se necessário para utilização futura</p> <p>Limpar o equipamento</p> <ul style="list-style-type: none">• Descarregar cassetes de controlo vazias• Esvaziar a gaveta de placas de amplificação• Esvaziar recipiente de resíduos líquidos• Esvaziar recipiente de resíduos sólidos

Resultados

O **cobas**® MTB deteta automaticamente o ADN do complexo MTB de amostras e de controlos, e indica se o teste foi validado, assim como os resultados individuais dos alvos.

Controlo de qualidade e validação dos resultados

- Com cada batch, são processados um **cobas**® Buffer Negative Control [(-) Ctrl] e um MTB Positive Control [MTB (+) C].
- No software **cobas**® 6800/8800 e/ou nos relatórios, verifique os alarmes e os resultados associados, para se certificar da validação do batch.
- Todos os alarmes são descritos na Assistência ao utilizador ou no Guia do utilizador dos **cobas**® 6800/8800 Systems.
- O batch é validado se não aparecer nenhum alarme para nenhum dos controlos. Se o batch for invalidado, repita os testes de todo o batch.

A validação dos resultados do batch é feita automaticamente pelo software **cobas**® 6800/8800 com base no desempenho do controlo positivo e do controlo negativo, e a validação dos resultados de amostras individuais é feita pelo software **cobas**® 6800/8800 com base nos resultados do controlo interno.

Interpretação dos resultados

Figura 3 Exemplo de resultados do **cobas**® MTB

Teste	ID de amostra	Valid	Alarmes	Tipo de amostra	Resultado geral	Alvo 1
MTB 850 ul	TB_R_0001	NA		Raw sputum	NA	MTB Negative
MTB 850 ul	TB_R_0002	NA		Raw sputum	NA	MTB Positive
MTB 850 ul	TB_R_0003	NA	P02T	Raw sputum	NA	Invalid
MTB 850 ul	TB_S_0001	NA		Sediment	NA	MTB Negative
MTB 850 ul	TB_S_0002	NA		Sediment	NA	MTB Positive
MTB 850 ul	TB_S_0003	NA	C02H1	Sediment	NA	Invalid
MTB 850 ul	C161420284090428828404	Yes		(-) Ctrl	Valid	Valid
MTB 850 ul	C161420284093009580264	Yes		MTB (+) C	Valid	Valid

Interpretação dos resultados

Para um batch válido, verifique todas as amostras individuais relativamente a alarmes no software **cobas**® 6800/8800 e/ou nos relatórios. A interpretação do resultado deverá ser como se segue:

- Um batch válido pode incluir resultados válidos e inválidos.
- As colunas “Válido” e “Resultado geral” não são aplicáveis (NA) a resultados de amostras do **cobas**® MTB e estão assinaladas com “NA”. Os valores indicados nestas colunas não são aplicáveis e **não** têm impacto na validade dos resultados indicados nas colunas individuais de resultados alvo.

- Os resultados alvo indicados para cada amostra são válidos salvo se indicados como “Invalid” na coluna de resultado alvo individual.
- Os resultados deste teste só deverão ser interpretados em conjunto com a informação disponível da avaliação clínica do paciente e do histórico do paciente.

A Tabela 16 apresenta os resultados da deteção de MTB e a respetiva interpretação.

Tabela 16 Resultados e interpretação do **cobas®** MTB

Alvo 1	Interpretação
MTB Positive	Resultado válido para o teste pedido. Sinal alvo detetado relativamente a ADN do complexo <i>M. tuberculosis</i> .
MTB Negative	Resultado válido para o teste pedido. Nenhum sinal alvo detetado relativamente a ADN do complexo <i>M. tuberculosis</i> .
Invalid	O resultado de MTB é inválido. A amostra original deverá ser novamente testada para se obter resultados válidos em relação à MTB. Se o resultado ainda for inválido e se excluir a possibilidade de erro do equipamento, deverá ser obtida uma nova amostra.

Limitações do procedimento

- O **cobas®** MTB deve ser sempre executado juntamente com culturas para minimizar o risco de resultados falsos negativos, assim como para permitir testes de suscetibilidade a fármacos dos isolados do MTBC para ajudar na gestão do paciente.
- O desempenho do **cobas®** MTB foi validado para expetoração e para sedimentos de LBA e de expetoração que tenham sido liquefeitos, descontaminados e concentrados utilizando NALC-NaOH. A utilização de outros tipos de amostra poderá dar origem a resultados falsos positivos, falsos negativos e/ou inválidos.
- A digestão e descontaminação deverão ser efetuadas utilizando os procedimentos de NALC-NaOH recomendados pelo CDC.¹⁵ A utilização de procedimentos alternativos de preparação de amostras pré-analíticas poderá dar origem a resultados falsos positivos, falsos negativos e/ou inválidos.
- O **cobas®** MTB foi validado para utilização com amostras de expetoração e de sedimentos de LBA e de expetoração tratados com NALC-NaOH, quimicamente inativadas utilizando MIS. Não foram avaliados outros procedimentos de inativação, e os mesmos poderão dar origem a resultados falsos positivos, falsos negativos e/ou inválidos.
- O êxito da inativação da TB depende do cumprimento dos procedimentos descritos no presente documento e da mistura completa da amostra com a MIS. O tratamento pré-analítico de amostras de paciente com a MIS reduz, mas não elimina completamente, o risco de infeção por TB.
- Exceder os limites de volume e/ou não seguir os passos dos procedimentos descritos nas secções “Processamento de amostras de expetoração” ou “Processamento de sedimentos de LBA e de expetoração” e “Processamento ultrassónico de amostras” pode dar origem a resultados falsos positivos, falsos negativos e/ou inválidos.
- Ensaio de amplificação dos ácidos nucleicos são incapazes de determinar a viabilidade do organismo.
- O sucesso ou fracasso terapêutico não pode ser determinado utilizando este teste.
- A utilização deste produto deve estar limitada a pessoal com formação em técnicas de PCR e na utilização dos **cobas®** 6800/8800 Systems.

- O **cobas**® MTB foi avaliado apenas para utilização em combinação com o **cobas**® MTB Positive Control Kit, o **cobas**® Buffer Negative Control Kit, o **cobas** **omni** MGP Reagent, o **cobas** **omni** Lysis Reagent, o **cobas** **omni** Specimen Diluent e o **cobas** **omni** Wash Reagent para utilização nos **cobas**® 6800/8800 Systems, a MIS e o dispositivo de processamento ultrassónico de tubos TS 5 da Rinco Ultrasonics AG.
- A obtenção de resultados fiáveis está dependente de procedimentos corretos de colheita, armazenamento e manuseamento da amostra.
- O **cobas**® MTB não foi avaliado em pacientes com menos de 18 anos.
- O **cobas**® MTB não é indicado para ser utilizado com amostras respiratórias de doentes que estão a ser tratados com medicação antituberculosa, para monitorização de resposta a tratamentos nem como um teste para a cura.
- O **cobas**® MTB não distingue entre as várias espécies do complexo MTB.
- A deteção da *M. tuberculosis* depende do número de microrganismos presentes na amostra e pode ser afetada pelos métodos de colheita da amostra e por fatores inerentes ao próprio paciente (por ex., a idade, a gravidade da doença, o estado do HIV).
- Para pacientes que estejam infetados com a MTB e também com o HIV, existe uma maior probabilidade das amostras serem negativas na microscopia de esfregaços e portanto terem presente ADN do complexo MTB a níveis abaixo do limite de deteção do ensaio.
- Os prestadores de cuidados de saúde devem interpretar os resultados no contexto do histórico do paciente, nos sintomas clínicos, e também outros resultados de testes laboratoriais e de radiografias.
- Podem registar-se resultados falsos negativos ou inválidos devido à inibição da polimerase. O Controlo Interno está incluído no **cobas**® MTB para ajudar a identificar as amostras que contêm substâncias passíveis de interferir com o isolamento do ácido nucleico e a amplificação por PCR.
- A adição de enzima AmpErase ao reagente de mistura principal do **cobas**® MTB permite a amplificação seletiva do ADN alvo; no entanto, para evitar a contaminação dos reagentes, é necessário observar boas práticas de laboratório e cumprir cuidadosamente os procedimentos especificados neste documento de instruções de utilização.
- Embora raras, as mutações dentro das regiões altamente conservadas do ADN genómico do complexo *M. tuberculosis* cobertas pelos primers e/ou sondas do **cobas**® MTB podem resultar na não deteção da presença da bactéria.
- Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudarem de uma tecnologia para outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos nos seus laboratórios, para qualificar as diferenças tecnológicas. Não se prevê uma concordância de cem por cento entre os resultados, devido às diferenças anteriormente referidas entre tecnologias.
- A utilização de tubos que não sejam os recomendados na Tabela 11, tem de ser verificada pelo utilizador antes da implementação do fluxo de trabalho do **cobas**® MTB no laboratório. A utilização de outros tipos de tubos pode provocar danos nos tubos e contaminação nas superfícies do dispositivo de processamento ultrassónico. Podem também ocorrer resultados falsos negativos devido a transferência de energia insuficiente no processamento ultrassónico.
- A utilização de códigos de barras que não sejam os recomendados na Tabela 11, tem de ser verificada pelo utilizador antes da implementação do fluxo de trabalho do **cobas**® MTB no laboratório. A utilização de outros tipos de códigos de barras pode causar danos no código de barras.

Avaliação do desempenho

Características principais de desempenho

Inativação de amostras

Foi avaliada a redução do risco de infecção pela MTB através do tratamento das amostras com MIS, utilizando culturas altamente positivas de 2 estripes do complexo MTB (MTB CDC268 e MTB H37) em 3 diferentes localizações e utilizando 3 diferentes lotes de reagente MIS. Para cada condição, foram tratadas com MIS, 5 alíquotas de cultura com níveis de concentração até 5×10^7 CFU/ml, num rácio de 1:2 durante 60 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram depois centrifugadas durante 15 minutos a 3000 x g, lavadas duas vezes com PBS esterilizado e finalmente ressuspensas em 0,5 ml de PBS esterilizado. Em 2 localizações, a amostra totalmente inativada foi inoculada e testada quanto a crescimento, utilizando o sistema de deteção microbiana BACTEC™ MGIT™ 320 (Becton Dickinson). Na 3ª localização, foi testada a viabilidade do MTB no meio sólido Löwenstein-Jensen (LJ). Nenhuma das amostras inativadas apresentou crescimento bacterial do complexo *M. tuberculosis* no final do período de incubação de 56 dias.

Limite de deteção (LoD)

O limite de deteção do cobas® MTB foi determinado por análise de diluições em série de 2 estripes do complexo MTB (*M. tuberculosis* CDC268 e *M. bovis* BCG, o 1º reagente de referência da OMS para vacina do BCG da sub-estripe 1331 dinamarquesa) cada uma em 2 matrizes clínicas negativas em pool - expetoração e sedimentos de LBA/expetoração. Foram testados painéis de 7 a 9 níveis de concentração e ainda um branco para um total de 72 réplicas por nível de concentração, utilizando 3 lotes de reagentes do teste cobas® MTB, através de várias corridas e diferentes dias, operadores e equipamentos.

O LoD para a *M. tuberculosis* variou entre 7,6 CFU/ml (sedimentos de LBA/expetoração) e 8,8 CFU/ml (expetoração).

O LoD para a *M. tuberculosis* variou entre 0,9 CFU/ml (sedimentos de LBA/expetoração) e 1,0 CFU/ml (expetoração).

Inclusividade

A inclusividade do cobas® MTB para 10 membros do complexo MTB foi confirmada testando as seguintes 22 estripes:

- *M. tuberculosis* (H37 ATCC®-25177™, TB-TDR-0032, TB-TDR-0039, TB-TDR-0105, TB-TDR-0114, TB-TDR-0115, TB-TDR-0116, TB-TDR-0131, TB-TDR-0144, TB-TDR-0185, TB-TDR-0198, 80552)
- *M. bovis* BCG (sub-estripe Tóquio 172 NIBSC 07/270 OMS, sub-estripe Moscovo NIBSC 07/274 OMS)
- *M. africanum* (ATCC® 25420™)
- *M. bovis* subsp. *bovis* (ATCC® 19210™)
- *M. canetti* (NLA 000016778)
- *M. caprae* (ATCC® BAA-824™)
- *M. microti* (ATCC® 19422™)
- *M. orygis* (NLA 001300863)
- *M. pinnipedii* (ATCC® BAA-688™)
- *M. suricattae* (492, Stellenbosch University, Tygerberg, África do Sul)

No tipo de amostra de sedimento, todas as estripes foram detetadas a 28,2 CFU/ml. Para a *M. suricattae* foi testado o equivalente de ADN genómico a 28,2 CFU/ml.

Precisão

A precisão interna foi examinada utilizando um painel composto por culturas de *M. tuberculosis* (CDC268) e *M. bovis* BCG (1º reagente de referência da OMS para vacina do BCG da sub-estripe 1331 dinamarquesa) diluídas em duas matrizes clínicas negativas em pool - expetoração e sedimentos de LBA/expetoração. Fontes de variabilidade foram examinadas com um painel composto por 3 níveis de concentração, utilizando 3 lotes de reagentes cobas® MTB e 2 equipamentos ao longo de um período de tempo de 12 dias e com um total de 24 corridas. A Tabela 17 apresenta uma descrição dos painéis de precisão e as taxas de positividade observadas. Todos os membros do painel negativo tiveram resultados negativos ao longo do estudo. A análise do desvio padrão e a percentagem do coeficiente de variação dos valores de Ct dos testes efetuados nos membros do painel positivos (ver a Tabela 18) produziram CV (%) globais entre 1,2% e 2,6% para a *M. tuberculosis* e o *M. bovis* BCG.

Tabela 17 Resumo da precisão intra-laboratório

Concentração do alvo	N.º de testados	N.º de positivos	Taxa de positividade	Intervalo de confiança de 95%	
				Limite inferior	Limite superior
<i>M. tuberculosis</i> - expetoração					
Negativa	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
8,8 CFU/ml	48	46	95,8%	85,7%	99,5%
26,4 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
<i>M. tuberculosis</i> - sedimento					
Negativa	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
7,6 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
22,8 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
<i>M. bovis</i> BCG - expetoração					
Negativa	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
1,0 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
3,0 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
<i>M. bovis</i> BCG - sedimento					
Negativa	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
0,9 CFU/ml	48	45	93,8%	82,8%	98,7%
2,7 CFU/ml	48	48	100,0%	92,6%	100,0%

Tabela 18 Média geral, desvios padrão e coeficientes de variação (%) para o limiar do ciclo nos painéis positivos para MTBC

Concen- tração do alvo	Taxa de positivi- dade	Ct Médio	Dentro da corrida		Entre corridas		Entre dias		Entre equipa- mentos		Entre lotes		Total		
			DP	CV%	DP	CV%	DP	CV%	DP	CV%	DP	CV%	DP	CV%	
<i>M. tuberculosis</i> - expetoração															
8,8 CFU/ml	95,8%	33,8	0,63	1,9	0,28	0,8	0,43	1,3	0,00	0,0	0,29	0,9	0,86	2,6	
26,4 CFU/ml	100,0%	32,4	0,54	1,7	0,07	0,2	0,00	0,0	0,30	0,9	0,00	0,0	0,62	1,9	
<i>M. tuberculosis</i> - sedimento															
7,6 CFU/ml	100,0%	34,9	0,35	1,0	0,09	0,3	0,14	0,4	0,19	0,5	0,00	0,0	0,43	1,2	
22,8 CFU/ml	100,0%	33,9	0,36	1,1	0,22	0,6	0,00	0,0	0,17	0,5	0,06	0,2	0,46	1,4	
<i>M. bovis</i> BCG - expetoração															
1,0 CFU/ml	100,0%	33,5	0,67	2,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,22	0,7	0,71	2,1	
3,0 CFU/ml	100,0%	32,4	0,40	1,2	0,30	0,9	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,50	1,5	
<i>M. bovis</i> BCG - sedimento															
0,9 CFU/ml	93,8%	35,1	0,45	1,3	0,00	0,0	0,17	0,5	0,00	0,0	0,17	0,5	0,51	1,5	
2,7 CFU/ml	100,0%	34,1	0,39	1,1	0,00	0,0	0,18	0,5	0,00	0,0	0,09	0,3	0,44	1,3	

Especificidade analítica/reactividade cruzada

Para avaliar a especificidade analítica, o **cobas**® MTB foi utilizado para testar um painel de 178 bactérias, fungos e vírus, incluindo os normalmente encontrados no trato respiratório. Os microrganismos indicados na Tabela 19 foram testados em concentrações de aproximadamente 1×10^6 unidades/ml para bactérias e 1×10^5 unidades/ml para vírus. Foram executados testes com cada microrganismo potencialmente interferente na ausência e na presença de alvo de complexo MTB (a 200 CFU/ml). Nenhum dos microrganismos interferiu com o desempenho do teste gerando resultados falsos positivos. A detecção de alvo de complexo MTB não foi afetada pelos microrganismos testados. Foi avaliada *in silico* a potencial reatividade cruzada do *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium mantanii* e do *Mycobacterium timonense*. Os resultados das análises *in silico* preveem uma probabilidade muito baixa de amplificação e detecção destes microrganismos ao utilizar o **cobas**® MTB.

Tabela 19 Microrganismos testados relativamente a especificidade analítica/reactividade cruzada

Microrganismo	Concentração	Microrganismo	Concentração
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium gastrii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium gordonae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium holsaticum</i>	1,0E+06 CFU/ml
Adenovírus	1,0E+05 U/ml	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intermedium</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kumamontense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bactericides fragilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycobacterium malmoense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bordetella parapertussis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marinum</i>	1,0E+06 CFU/ml

Microrganismo	Concentração	Microrganismo	Concentração
<i>Bordetella pertussis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marseillense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida albicans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida glabrata</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida krusei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium simiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida tropicalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,0E+06 IFU/ml	<i>Mycobacterium szulgai</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	1,0E+06 IFU/ml	<i>Mycobacterium terrae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Citrobacter freundii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium triviale</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vaccae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vulneris</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium xenopi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium yongonense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,0E+06 ccu/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria lactamica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Citomegalovírus	1,0E+05 IFU/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Eikenella corrodens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria mucosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria sicca</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia asteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus avium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia farcinica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Enterovírus Tipo 68/2007	1,0E+05 U/ml	<i>Nocardia nova</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i> produtora de CTX-M-15 ESBL	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia transvalensis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>tigris</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Gordona rubropertinctus</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Penicillium chermesinum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus do herpes simples do tipo 1	1,0E+05 cp/ml	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus do herpes simples do tipo 2	1,0E+05 cp/ml	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus da imunodeficiência humana	1,0E+05 cp/ml	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus da gripe A humana	1,0E+05 U/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus da gripe B humana	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1,0E+06 CFU/ml
Metapneumovírus humano	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus da parainfluenza humana tipo 1	1,0E+05 U/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus da parainfluenza humana tipo 2	1,0E+05 U/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus da parainfluenza humana tipo 3	1,0E+05 U/ml	<i>Rhizopus</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
Vírus da parainfluenza humana tipo 4	1,0E+05 U/ml	<i>Rhodococcus equi</i>	1,0E+06 CFU/ml

Microrganismo	Concentração	Microrganismo	Concentração
Vírus sincicial respiratório A humano	1,0E+05 U/ml	Vírus da rubéola (sarampo alemão)	1,0E+05 U/ml
Vírus sincicial respiratório B humano	1,0E+05 U/ml	Vírus da rubéola	1,0E+05 U/ml
Rinovírus humano 16	1,0E+05 U/ml	Rubulavírus (vírus da Caxumba Humana)	1,0E+05 U/ml
<i>Kingella kingae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	1,0E+06 CFU/ml
<i>Kingella oralis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Scedosporium</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC-3	1,0E+06 CFU/ml	<i>Shigella flexneri</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Shigella sonnei</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella micdadei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium arosiense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Streptococcus mitis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus mutans</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium bouchedorhonense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium celatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus uberis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chimaera</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptomyces anulatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chubuense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptomyces griseus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium colombiense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Tsukamurella</i> spp.	1,0E+06 geq/ml
<i>Mycobacterium confluentis</i>	1,0E+06 CFU/ml	Vírus da varicela-zoster	1,0E+05 cp/ml
<i>Mycobacterium flavescens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Veillonella atypica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Veillonella parvula</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium fuerth</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Weissella paramesenteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml

Interferência

Foi avaliado o efeito de substâncias exógenas que podem ser segregadas em amostras respiratórias (Tabela 20). Foram testadas todas as substâncias potencialmente interferentes a níveis iguais ou acima dos clinicamente relevantes em amostras de expetoração na ausência e na presença de alvo de complexo MTB (adicionado a 200 CFU/ml).

Nenhuma das substâncias interferiu com o desempenho do teste gerando resultados falsos negativos ou falsos positivos.

Tabela 20 Lista de substâncias exógenas testadas relativamente a interferência

Substância	Concentração	Substância	Concentração
Sulfato de salbutamol	0,5 µg/ml	Sulfato de canamicina	240 µg/ml
Amicacina	80,1 µg/ml	Levofloxacina	5 mg/ml
Amoxicilina	86,4 µg/ml	Lidocaína HCl	1,2% (p/v)
Beclometasona	3459 µg/ml	Mentol	0,50% (p/v)
Benzocaína	1,2% (p/v)	Salicilato de metilo	0,06% (v/v)
Budesonida	3 mg/ml	Mometasona	100 µg/ml
Extrato de Butterbur	225 mg/ml	Moxifloxacina	15 µg/ml
Capreomicina	80 µg/ml	Mupirocina	5% (p/v)
Cloreto de cetilpiridínio	0,5% (p/v)	NaCl	5% (p/v)
Gluconato de clorexidina	1% (v/v)	Nicotina	1 µg/ml
Cicloserina	105 µg/ml	Nistatina	1% (v/v)
Clarithromycin	20 µg/ml	Oximetazolina	12 ng/ml
Dexametasona	601 ng/ml	Pentamidina	1366 ng/ml
Cloridrato de efedrina	1 mg/ml	Fenilefrina	5 mg/ml
Epinefrina	100 µg/ml	Prednisolona	3 µg/ml
Ethambutol	50 µg/ml	Pyrazinamide	240 µg/ml
Etionamida	15 µg/ml	Rifampicin	25 µg/ml
Eucaliptol	0,002% (v/v)	Extrato de urtiga (500 mg)	5 mg/ml
Flunisolida	400 µg/ml	Estreptomina	240 µg/ml
Propionato de fluticasona	5 µg/ml	Enxofre	0,01% (p/v)
Fumarato de formoterol di-hidratado	66 µg/ml	Óleo da árvore de chá	0,50% (v/v)
Raiz Goldenseal (cápsulas 570 mg)	5,7 mg/ml	Teofilina	20 µg/ml
Guaifenesina	5 mg/ml	Tobramicina	24,1 µg/ml
Isoniazida	50 µg/ml	Zanamivir	10 mg/ml

Foram testadas, relativamente a interferência, substâncias endógenas que podem estar presentes em amostras respiratórias (Tabela 21). Foram testadas todas as substâncias potencialmente interferentes a níveis iguais ou acima dos clinicamente relevantes em amostras de expetoração na ausência e na presença de alvo de complexo MTB (adicionado a 200 CFU/ml).

Nenhuma das substâncias interferiu com o desempenho do teste gerando resultados falsos negativos ou falsos positivos.

Tabela 21 Lista de substâncias endógenas testadas relativamente a interferência

Substância	Concentração	Substância	Concentração
Suco gástrico	10% (v/v)	Mucina	5%
Hemoglobina	2 g/l	Pus	5%
Sangue total humano	5% (v/v)	Saliva	10% (v/v)
hDNA	4 mg/l	-	-

Falha global do sistema

As amostras testadas no estudo de falha global do sistema eram amostras de expetoração e amostras de sedimento de expetoração, adicionadas na respetiva matriz, com alvo do complexo MTB a uma concentração de aproximadamente 3 x o LoD do cobas® MTB. Os resultados demonstraram que todas as réplicas eram válidas e positivas para o alvo de complexo MTB, originando uma taxa de falha do sistema global de 0%, com um intervalo de confiança superior unilateral de 95% de 3,0%.

Contaminação cruzada

Foram efetuados estudos para avaliar a potencial contaminação cruzada nos cobas® 6800/8800 Systems ao utilizar o cobas® MTB. A contaminação cruzada pode causar resultados falsos positivos. Neste estudo de desempenho, a taxa de contaminação cruzada de amostra para amostra do cobas® MTB foi determinada como sendo 0,0% (0/240) para o complexo MTB, ao serem testadas alternadamente amostras altamente positivas e negativas no decorrer de várias corridas. Os testes foram efetuados utilizando amostras de sedimento de expetoração adicionadas de alvo de complexo MTB a 2×10^6 CFU/ml, uma concentração de amostra que gera valores de Ct anteriores a 95% das amostras de pacientes infetados da população que, previsivelmente, será alvo da utilização do teste.

Desempenho utilizando amostras clínicas

Foi avaliado o desempenho do cobas® MTB com amostras clínicas, testando amostras prospetivas e arquivadas (expetoração e sedimentos de LBA/expetoração) de sujeitos com presumível TB colhidas na Alemanha, África do Sul, Suíça, Uganda e Ucrânia. Foram efetuados testes de comparação lado a lado com o ensaio Abbott RealTime MTB. A sensibilidade e a especificidade foram estabelecidas em comparação com culturas e o estado de esfregaços de BAAR.

Os resultados são indicados na Tabela 22. Todos os resultados positivos do cobas® MTB para amostras de cultura negativas, foram confirmados serem eventos de amplificação/deteção específicos, por análise de amplicons pós PCR.

Tabela 22 Sensibilidade e especificidade do **cobas®** MTB utilizando amostras clínicas

			Roche cobas® MTB	Abbott RealTime MTB
Sensibilidade	Expetoração	C+/S-	116/134 86,6% [79,6 – 91,8%]	111/134 82,8% [75,4 – 88,8%]
		C+/S+	275/278 98,9% [96,9 – 99,7%]	274/278 98,5% [96,3 – 99,6%]
		C+/S±	391/412 94,9% [92,3 – 96,8%]	385/412 93,4% [90,6 – 95,6%]
	Sedimento	C+/S-	116/148 78,4% [70,9 – 84,7%]	121/148 81,8% [74,6 – 87,6%]
		C+/S+	287/289 99,3% [97,5 – 99,9%]	284/289 98,2% [96,0 – 99,4%]
		C+/S±	403/437 92,2% [89,3 – 94,5%]	405/437 92,6% [89,8 – 94,9%]
Especificidade	Expetoração	C-/S-	326/332 98,2% [96,1 – 99,3%]	N/A
	Sedimento	C-/S-	381/393 96,9% [94,7 – 98,4%]	N/A

C = Cultura, S = esfregaços de BAAR

Foi testado um subconjunto de amostras numa avaliação externa do Clinical Laboratory Services (CLS) na África do Sul. Para cada sujeito, foram colhidas amostras de expetoração em duas consultas. Uma expetoração foi testada com **cobas®** MTB, Abbott RealTime MTB e GeneXpert® MTB/RIF. Outra expetoração foi processada para um sedimento pelo método de NALC-NaOH e testada com **cobas®** MTB, Abbott RealTime MTB, GeneXpert® MTB/RIF e testes COBAS® TaqMan® MTB. A sensibilidade e a especificidade foram estabelecidas em comparação com culturas e o estado de esfregaços de BAAR.

Os resultados são indicados na Tabela 23.

Tabela 23 Sensibilidade e especificidade do cobas® MTB utilizando amostras clínicas colhidas na África do Sul

			Roche cobas® MTB	Abbott RealTime MTB	Cepheid Xpert MTB/RIF	Roche COBAS® TaqMan® MTB
Sensibilidade	Expetoração	C+/S-	18/22 81,8% [59,7 – 94,8%]	16/22 72,7% [49,8 – 89,3%]	16/22 72,7% [49,8 – 89,3%]	N/A
		C+/S+	72/73 98,6% [92,6 – 100%]	72/73 98,6% [92,6 – 100%]	71/73 97,3% [90,5 – 99,7%]	N/A
		C+/S±	90/95 94,7% [88,1 – 98,3%]	88/95 92,6% [85,4 – 97,0%]	87/95 91,6% [84,1 – 96,3%]	N/A
	Sedimento	C+/S-	17/22 77,3% [54,6 – 92,2%]	17/22 77,3% [54,6 – 92,2%]	17/22 77,3% [54,6 – 92,2%]	13/22 59,1% [36,4 – 79,3%]
		C+/S+	73/73 100% [95,1 – 100%]	71/73 97,3% [90,5 – 99,7%]	73/73 100% [95,1 – 100%]	73/73 100% [95,1 – 100%]
		C+/S±	90/95 94,7% [88,1 – 98,3%]	88/95 92,6% [85,4 – 97,0%]	90/95 94,7% [88,1 – 98,3%]	86/95 90,5% [82,8 – 95,6%]
Especificidade	Expetoração	C-/S-	193/199 97,0% [93,6 – 98,9%]	192/199 96,5% [92,9 – 98,6%]	194/199 97,5% [94,2 – 99,2%]	N/A
	Sedimento	C-/S-	190/199 95,5% [91,6 – 97,9%]	189/199 95,0% [91,0 – 97,6%]	196/199 98,5% [95,7 – 99,7%]	193/196 98,5% [95,6 – 99,7%]

Informações adicionais

Características principais do teste

Tipos de amostras

- Expetoração
- Sedimentos de LBA e de expetoração tratados com NALC-NaOH

Quantidade de amostra processada

- Dos $\geq 0,4$ ml de amostra de paciente tratada com MIS num rácio de 1:2 (volume total $\geq 1,2$ ml) necessários no tubo de amostra para expetoração, o equipamento processa 0,85 ml
- Dos $\geq 0,2$ ml de amostra de paciente tratada com MIS num rácio de 1:5 (volume total $\geq 1,2$ ml) necessários no tubo de amostra para sedimentos de LBA/expetoração, o equipamento processa 0,85 ml























Duração do teste

- < 3,5 horas para o primeiro resultado

Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche.

Tabela 24 Símbolos utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

	Software auxiliar		Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Limite inferior do intervalo atribuído
	Folha de dados de códigos de barras		Fabricante
	Código do batch		Armazenar no escuro
	Risco biológico		Conteúdo suficiente para <n> testes
	Referência de catálogo		Limite de temperatura
	Consulte as instruções de utilização		Ficheiro de definição de teste
	Conteúdo do kit		Limite superior do intervalo atribuído
	Distribuído por		Prazo de validade
	Apenas para avaliação do desempenho IVD		Global Trade Item Number
Rx Only	Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a um profissional licenciado ou a pedido deste.		Data do fabrico
	Marcação de conformidade CE; este dispositivo está em conformidade com os requisitos aplicáveis para marcação CE de um dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		

Apoio Técnico a Clientes EUA 1-800-526-1247

Fabricante e distribuidores

Tabela 25 Fabricante e distribuidores



Fabricado nos Estados Unidos

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com



Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marcas comerciais e patentes

Este produto está coberto por um ou mais patentes dos EUA n.ºs 8097717, 8192958, 10059993, 10358675, 8609340, 9234250, 8129118 e 6727067, e respetivas patentes estrangeiras equivalentes.

COBAS, COBAS OMNI e AMPERASE são marcas comerciais da Roche.

Todos os outros nomes de produtos e marcas comerciais são propriedade dos respetivos titulares.

A tecnologia de prevenção de carryover na enzima AmpErase® está coberta pela patente dos EUA n.º 7,687,247 de propriedade da Life Technologies e licenciada para a Roche Molecular Systems, Inc.

Consulte <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Copyright

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografia

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva, Switzerland; WHO, 2018.
2. Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *Infect Dis.* 2015;211 Suppl 2:S21-8.
3. Centers for Disease Control and Prevention. *Mycobacterium bovis (Bovine Tuberculosis) in Humans*, in Centers for Disease Control and Prevention Fact Sheets D.o.T. Elimination, Editor. 2011. p. September 9, 2011.
4. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*; *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1296-9.
5. Novosad SA, Winthrop KL. Beyond tumor necrosis factor inhibition: the expanding pipeline of biologic therapies for inflammatory diseases and their associated infectious sequelae. *Clin Infect Dis.* 2014;58:1587-98.
6. The Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR Recomm Rep.* 2000;49(RR-6):1-51.
7. The Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for use of an isoniazid-rifapentine regimen with direct observation to treat latent Mycobacterium tuberculosis infection. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011;6D(48):1650-3.
8. Falzon D, Jaramillo E, Schönemann, HJ, et al. WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. *Eur Respir J.* 2011;38:516-28.
9. Longo MC, Berninger, MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990;93:125-8.
10. Higuchi R, Dollinger, G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY).* 1992;10:413-7.
11. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research.* 1996;6:986-94.
12. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.
14. World Health Organization. Tuberculosis laboratory biosafety manual. Geneva, Switzerland; WHO, 2012.
15. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory:Atlanta, GA;U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 1985.

Revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev. 3.0 11/2020	Símbolo "Rx Only" inserido na primeira página. Atualizadas as advertências de risco. Atualizada a página de símbolos harmonizados. Atualizados os endereços de distribuidores. Atualizada a secção Marcas comerciais e patentes . Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.