

cobas[®] MTB-RIF/INH

**Teste de ácidos nucleicos
para utilização com os sistemas cobas[®] 5800/6800/8800**

Para diagnóstico *in vitro*

cobas[®] MTB-RIF/INH

P/N: 09040617190

Para utilização no sistema cobas[®] 5800

cobas[®] MTB-RIF/INH Positive Control Kit

P/N: 09040625190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Para utilização nos sistemas cobas[®] 6800/8800

cobas[®] MTB-RIF/INH Positive Control Kit

P/N: 07833342190 ou
P/N: 09040625190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 ou
P/N: 09051953190

Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação do teste	4
Reagentes e materiais	7
Reagentes e controlos do cobas® MTB-RIF/INH.....	7
Reagentes cobas® omni para preparação da amostra	9
Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes	10
Requisitos de manuseamento de reagentes para o sistema cobas® 5800.....	10
Requisitos de manuseamento de reagentes para os sistemas cobas® 6800/8800.....	11
Materiais adicionais necessários para o sistema cobas® 5800.....	12
Materiais adicionais necessários para os sistemas cobas® 6800/8800.....	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	17
Amostra	17
Transporte e armazenamento de amostras.....	17
Armazenamento de amostras inativadas	17
Instruções de utilização	18
Notas do procedimento	18
Processamento de amostras de expetoração em bruto	21
Processamento de sedimentos de expetoração e de LBA.....	21
Processamento ultrassónico de amostras.....	22
Execução do cobas® MTB-RIF/INH no sistema cobas® 5800.....	23
Execução do cobas® MTB-RIF/INH nos sistemas cobas® 6800/8800.....	25
Resultados	26
Controlo de qualidade e validade dos resultados no sistema cobas® 5800	26
Resultados de controlo no sistema cobas® 5800	26

Controlo de qualidade e validade dos resultados nos sistemas cobas® 6800/8800	26
Interpretação dos resultados.....	27
Interpretação dos resultados no sistema cobas® 5800.....	30
Interpretação dos resultados nos sistemas cobas® 6800/8800.....	31
Limitações do procedimento	32
Avaliação do desempenho.....	34
Características dos desempenhos principais executados nos sistemas cobas® 6800/8800.....	34
Inativação de amostras.....	34
Limite de deteção (LoD)	34
Heterorresistência.....	35
Inclusividade das mutações associadas a resistência.....	35
Especificidade do complexo MTB de wild-type	36
Precisão	36
Especificidade analítica/reatividade cruzada	37
Interferência	40
Falha global do sistema	41
Contaminação cruzada	41
Desempenho utilizando amostras clínicas	41
Equivalência dos sistemas/comparação dos sistemas.....	43
Informações adicionais	44
Características principais do ensaio.....	44
Símbolos	45
Apoio técnico	46
Fabricante.....	46
Marcas comerciais e patentes	46
Direitos de autor.....	46
Bibliografia	47
Revisão do documento	48

Utilização prevista

O cobas® MTB-RIF/INH para utilização nos sistemas cobas® 5800/6800/8800 é um teste automatizado, qualitativo, de diagnóstico *in vitro*, que utiliza reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, para a detecção direta de mutações associadas a resistência à rifampicina do gene *rpoB* e mutações associadas a resistência à isoniazida nos genes *katG* e *inhA*, da *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de amostras respiratórias humanas. O teste destina-se a ser utilizado em expetoração em bruto e amostras digeridas e descontaminadas (tratadas com N-acetil-L-cisteína/NaOH) de expetoração e de lavados brônquio-alveolares (LBA), que deram resultados positivos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) pelo cobas® MTB. Este teste destina-se a ser utilizado em conjunto com culturas e testes de suscetibilidade a fármacos, e como um teste reflexo juntamente com o cobas® MTB, como auxiliar no diagnóstico de infecção por uma *M. tuberculosis* multirresistente a fármacos (TB MRF).

Resumo e explicação do teste

Fundamentos

A tuberculose é uma infecção bacteriana causada pelo MTBC, que é um problema grave de saúde à escala mundial e é a causa principal de morte por doenças infecciosas no mundo inteiro.¹ A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que à volta de um quarto da população mundial está infetada com MTB, com um número estimado de 10,6 milhões de novas infeções de tuberculose (TB) e 1,3 milhões de mortes em 2022.¹ Estima-se que as pessoas que vivem com o HIV (PVHIV) resultem em 167 000 dos 1,3 milhões de mortes¹

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 (Bacillus Calmette–Guérin), *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. suricattae*, *M. orygis*, bacilo dassie e bacilo chimpanzé. 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 em diferentes definições geográficas.² Os outros membros do complexo MTB sem ser a *M. bovis* e *M. tuberculosis* são causas 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.).³

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”⁴ (por ex., inibidores de TNF) e infeção por HIV.^{5,6} 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 consequentemente 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 micobacteriana ou para esfregaços de bactérias álcool-ácido resistentes, assim como para testes de amplificação de ácidos nucleicos diretos. É indispensável que seja realizada cultura micobacteriana para além dos testes de amplificação de ácidos nucleicos, para ajudar a diminuir o risco de resultados falsos negativos, e para permitir os testes de suscetibilidade a fármacos para os pacientes que forem positivos.

Uma estirpe da TB resistente a fármacos é definida como sendo resistente a pelo menos um fármaco utilizado no tratamento da tuberculose. Uma TB multirresistente a fármacos (TB-MRF) é definida como sendo resistente a pelo menos à isoniazida e à rifampicina, os dois fármacos mais eficazes contra a tuberculose, e uma estirpe da TB extensivamente resistente a fármacos (TB-XRF) tem resistência adicional a rifampicina e a quaisquer fluoroquinolonas e um fármaco injetável de segunda linha (por ex., amicacina) ou pelo menos um dos fármacos bedaquilina e linezolida.

A frequência da TB-MRF varia de acordo com a região. A incidência da TB-MRF é maior entre os pacientes tratados anteriormente. O tratamento da tuberculose envolve a administração prolongada de vários fármacos e é geralmente efetivo. No entanto, o tratamento de estirpes de MTB resistentes a um ou mais fármacos torna a cura mais difícil. O tratamento da MDR-TB e XDR-TB exige a administração de vários fármacos tóxicos durante mais tempo do que com os pacientes de TB suscetíveis aos fármacos, e tem uma menor probabilidade de êxito.⁷

O diagnóstico de TB pode ser estabelecido com base em evidências clínicas, resultados laboratoriais e radiográficos, incluindo culturas micobacterianas 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 antígenos (p. ex., teste cutâneo da tuberculina, ensaio de liberação de interferon gama (INF γ) (IGRAs)).⁸ No entanto, o teste cutâneo da tuberculina e os ensaios IGRA são negativos na doença ativa e não pode diferenciar a infeção latente da doença ativa. O diagnóstico definitivo da doença é confirmado pela recuperação do organismo 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 é um processo lento, sendo necessário aguardar várias semanas pelos resultados, consoante o método. Alternativamente, para presumível diagnóstico mais rápido de resistência a fármacos, os marcadores genéticos associados de resistência a fármacos podem ser detetados diretamente a partir de espécimes clínicos ou isolados de cultura 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.⁸

Explicação do teste

O cobas® MTB-RIF/INH para utilização com os sistemas cobas® 5800/6800/8800 é um teste de PCR em tempo real, automatizado e qualitativo concebido como um teste reflexo juntamente com o cobas® MTB para detetar mutações do gene *rpoB* associadas a resistência à rifampicina e mutações nos genes *katG* e *inhA* do complexo *Mycobacterium tuberculosis* associadas a resistência à isoniazida. O teste destina-se a ser utilizado em expetoração em bruto em bruto e amostras digeridas e descontaminadas (tratadas com N-acetil-L-cisteína/NaOH) de expetoração e de lavados brônquio-alveolares (LBA), que deram resultados positivos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) pelo cobas® MTB. A deteção de ADN do complexo MTB de wild-type serve como um controlo interno para monitorizar todo o processo de preparação de amostras e amplificação por PCR. Adicionalmente, o teste utiliza um controlo positivo de título baixo e um controlo negativo.

Princípios do procedimento

O **cobas**® MTB-RIF/INH baseia-se na liquefação pré-analítica e inativação micobacteriana da amostra, seguida do processamento ultrassônico da amostra e da preparação totalmente automatizada da amostra (extração e purificação dos ácidos nucleicos) e amplificação e detecção por PCR. A liquefação e a inativação micobacteriana da amostra ocorrem simultaneamente durante a incubação da amostra com **cobas**® Microbial Inactivation Solution (MIS) (Solução de inativação microbiana). O processamento ultrassônico da amostra liquefeita e inativada é efetuada antes do carregamento nos sistemas **cobas**® 5800/6800/8800. O sistema **cobas**® 5800 foi concebido como um equipamento integrado. Os sistemas **cobas**® 6800/8800 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**® 5800 ou **cobas**® 6800/8800, que atribui resultados de teste a todos os testes, na forma de positivos, negativos ou inválidos. Os resultados podem ser revistos diretamente no ecrã do sistema e podem ser exportados e impressos como um relatório. Os ácidos nucleicos de amostras de paciente e de controlos externos são extraídos em simultâneo. Em resumo, o ácido nucleico bacteriano é libertado por rutura química (MIS, **cobas**® **omni** Lysis Reagent), enzimática (proteínase) e física (processamento ultrassônico) 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 e detecção dos ácidos nucleicos alvo da amostra é conseguida através da utilização de primers senso e anti-senso específicos do gene alvo. 18 mutações associadas a resistência à rifampicina (gene *rpoB*) são detetadas por um conjunto de primer e várias sondas específicas da mutação. Sete mutações associadas a resistência à isoniazida (região promotora do gene *katG* e gene *inhA*) são detetadas por dois conjuntos de primers e várias sondas específicas da mutação. A MTB é detetada por um conjunto de primers e uma sonda visando uma sequência genómica de cópia única altamente conservada do complexo MTB. É utilizada uma enzima polimerase do ADN termoestável para a amplificação por PCR. As sequências alvo são amplificadas simultaneamente utilizando um perfil universal de amplificação por PCR com número de ciclos e passos 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 (amplicão). Qualquer amplicão contaminante de corridas de PCR anteriores é eliminado pela enzima AmpErase, que está incluída na mistura principal de PCR durante o primeiro passo de termociclagem.⁹ No entanto, os amplicons acabados de formar não são eliminados, uma vez que a enzima AmpErase fica inativa quando exposta a temperaturas acima dos 55 °C.

A mistura principal do **cobas**® MTB-RIF/INH contém várias sondas específicas de mutações associadas a resistência à rifampicina (RIF) e mutações associadas a resistência à isoniazida e uma sonda específica do complexo MTB. As sondas estão marcadas com corantes sinalizadores fluorescentes específicos do alvo, o que permite a detecção simultânea de mutações associadas a resistência à rifampicina, mutações associadas a resistência à isoniazida e do alvo do complexo MTB em 5 diferentes canais alvo (as mutações associadas a resistência à rifampicina são detetadas em 3 dos 5 canais de detecção).^{10, 11} Quando não ligado à sequência alvo, o sinal fluorescente das sondas intactas é suprimido pelo corante supressor. 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. Em cada ciclo da PCR, são geradas quantidades crescentes de sondas clivadas e o sinal cumulativo do corante reporter aumenta concomitantemente. A detecção e discriminação em tempo real dos produtos da PCR é conseguida medindo a fluorescência dos corantes sinalizadores libertados para mutações associadas a resistência à rifampicina, mutações associadas a resistência à isoniazida e para o alvo do complexo MTB, respetivamente.

Reagentes e materiais

Reagentes e controlos do cobas® MTB-RIF/INH

Os materiais fornecidos para o cobas® MTB-RIF/INH encontram-se na Tabela 1. Todos os reagentes e controlos não abertos devem ser armazenados conforme recomendado na Tabela 1 até à Tabela 4. Os materiais necessários, mas não fornecidos, encontram-se indicados desde a Tabela 2 à Tabela 4 e desde a Tabela 8 à Tabela 9.

Tabela 1 cobas® MTB-RIF/INH

cobas® MTB-RIF/INH

Conservar entre 2 e 8 °C

Cassete de 192 testes (P/N 09040617190)

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, glicerol EUH210: Ficha de segurança fornecida a pedido. EUH208: Contém subtilisina do <i>Bacillus subtilis</i> . Pode desencadear uma reação alérgica.	22,3 ml
Diluyente genérico de amostra (GSD)	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de estrutura de ARN armored sem relacionamento a MTB, 0,002% de ARN de Poli rA (sintético), < 0,1% de azida de sódio	21,2 ml
Tampão de Eluição (EB)	Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	21,2 ml
Reagente 1 da Mistura Principal (MMX-R1)	Acetato de manganês, hidróxido de potássio, < 0,1% de azida de sódio	7,5 ml
Reagente 2 da Master Mix de MTB-RIF/INH (MTB-RIF/INH 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 a jusante e a montante, < 0,01% de sondas de oligonucleótido marcadas com fluorescência específicas de mutações associadas a resistência à rifampicina, mutações associadas a resistência à isoniazida e do alvo do complexo MTB, < 0,01% de aptâmero oligonucleotídico	9,7 ml

Tabela 2 cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit

cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit

Conservar entre 2 e 8 °C

Para utilização no sistema cobas® 5800 (P/N 09040625190)

Para utilização nos sistemas cobas® 6800/8800 (P/N 07833342190 ou P/N 09040625190)

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit
MTB-RIF/INH controlo positivo (MTB-RIF/INH (+) 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 sequências genómicas de <i>M. tuberculosis</i> (região promotora de 16S, <i>rpoB</i> mutado e <i>inhA</i> mutado)	16 ml (16 × 1 ml)

Tabela 3 cobas® Buffer Negative Control Kit**cobas® Buffer Negative Control Kit**

Conservar entre 2 e 8 °C

Para utilização no sistema **cobas®** 5800 (P/N 09051953190)

Para utilização nos sistemas **cobas®** 6800/8800 (P/N 07002238190 ou P/N 09051953190)

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit
cobas® 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 × 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 de sódio	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 de sódio	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	 PERIGO H302: Nocivo por ingestão. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H411: Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. EUH071: Corrosivo para as vias respiratórias. P273: Evitar a libertação para o ambiente. P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial/proteção auditiva. 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. P391: Recolher o produto derramado. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol
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-RIF/INH. Consulte a lista dos materiais adicionais necessários (desde a Tabela 8 à Tabela 10).

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

*** Substância perigosa

09348484001-02PT

Doc Rev. 2.0

Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes

Os reagentes deverão ser armazenados e manuseados conforme especificado na Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7.

Quando os reagentes não estiverem no sistema cobas® 5800 ou nos sistemas cobas® 6800/8800, armazene-os à temperatura correspondente especificada na Tabela 5.

Tabela 5 Armazenamento de reagentes (quando o reagente não se encontra no sistema)

Reagente	Temperatura de armazenamento
cobas® MTB-RIF/INH	2 a 8 °C
cobas® MTB-RIF/INH 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

Requisitos de manuseamento de reagentes para o sistema cobas® 5800

Os reagentes carregados no sistema cobas® 5800 são armazenados a temperaturas apropriadas e as respetivas datas de validade são controladas pelo sistema. O sistema apenas permite que os reagentes sejam usados, se as condições indicadas na Tabela 6 forem satisfeitas. O sistema impede automaticamente a utilização de reagentes expirados. A Tabela 6 permite ao utilizador compreender as condições de manuseamento de reagentes exigidas pelo sistema cobas® 5800.

Tabela 6 Condições de manuseamento de reagentes exigidas pelo sistema cobas® 5800

Reagente	Prazo de validade do kit	Estabilidade do kit aberto	Número de corridas para as quais este kit pode ser usado	Estabilidade a bordo do equipamento
cobas® MTB-RIF/INH	Prazo não ultrapassado	90 dias desde a primeira utilização	Máx. 40 corridas	Máx. 36 dias ^b
cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável ^a	Não aplicável	Máx. 36 dias ^b
cobas® Buffer Negative Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável ^a	Não aplicável	Máx. 36 dias ^b
cobas® omni Lysis Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento ^b	Não aplicável	Não aplicável
cobas® omni MGP Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento ^b	Não aplicável	Não aplicável
cobas® omni Specimen Diluent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento ^b	Não aplicável	Não aplicável
cobas® omni Wash Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento ^b	Não aplicável	Não aplicável

^a Reagentes de utilização única.

^b O tempo é medido a partir da primeira vez que o reagente é carregado no sistema cobas® 5800.

Requisitos de manuseamento de reagentes para os sistemas cobas® 6800/8800

Os reagentes carregados nos sistemas **cobas®** 6800/8800 são armazenados a temperaturas apropriadas e as datas de validade são controladas pelo sistema. Os sistemas **cobas®** 6800/8800 apenas permitem que os reagentes sejam utilizados se todas as condições indicadas na Tabela 7 forem satisfeitas. O sistema impede automaticamente a utilização de reagentes expirados. A Tabela 7 permite ao utilizador compreender as condições de manuseamento de reagentes impostas pelos sistemas **cobas®** 6800/8800.

Tabela 7 Condições de manuseamento de reagentes exigidas pelos sistemas **cobas®** 6800/8800

Reagente	Prazo de validade do kit	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-RIF/INH	Prazo não ultrapassado	90 dias desde a primeira utilização	Máx. 40 corridas	Máx. 40 horas
cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável ^a	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas® Buffer Negative Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável ^a	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas® omni Lysis Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento ^b	Não aplicável	Não aplicável
cobas® omni MGP Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento ^b	Não aplicável	Não aplicável
cobas® omni Specimen Diluent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento ^b	Não aplicável	Não aplicável
cobas® omni Wash Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento ^b	Não aplicável	Não aplicável

^a Reagentes de utilização única.

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

Materiais adicionais necessários para o sistema cobas® 5800

Tabela 8 Material e consumíveis para utilização no sistema **cobas® 5800**

Material	P/N
cobas® omni Processing Plate 24	08413975001
cobas® omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas® omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Ponta CORE TIPS com filtro, 1 ml	04639642001
Ponta CORE TIPS com filtro, 300 µl	07345607001
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 ou Saco de resíduos sólidos com inserto	07435967001 ou 08030073001

Materiais adicionais necessários para os sistemas cobas® 6800/8800

Tabela 9 Material e consumíveis para utilizar nos sistemas **cobas® 6800/8800**

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 inserto e Kit modificado para a gaveta de resíduos sólidos	07435967001 e 07094361001 ou 08030073001 e 08387281001

Tabela 10 Outros materiais e consumíveis necessários para o fluxo de trabalho pré-analítico

Materiais
cobas® Microbial Inactivation Solution (P/N 08185476001)
Dispositivo de processamento ultrassônico de tubos TS 5 (Rinco Ultrasonics AG – P/N 46690)
Tubos de 75 × 13 mm de polipropileno de 5 ml, com tampas de enroscar e base redonda (Sarstedt – P/N do tubo 60.504.010, P/N da tampa 65.163)*
MPA RACK 13 MM LIGHT GREEN 7001-7050 (Roche – P/N 03118878001 ou equivalente)**
Centrífuga (opção para restringir RCF para um máx. de 3000 × g, compatível com tubos com tampa de enroscar de 75 × 13 mm)
Misturador de vórtex
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-RIF/INH 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 os Guias do utilizador e/ou de Assistência ao utilizador dos sistemas **cobas®** 5800/6800/8800. A utilização de etiquetas de código de barras que não sejam as recomendadas acima, tem de ser verificada pelo utilizador antes da implementação do fluxo de trabalho do **cobas®** MTB-RIF/INH 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®** 5800 e o pacote de análise **cobas®** MTB-RIF/INH para o sistema **cobas®** 5800 têm que estar instalados no equipamento **cobas®** 5800. O software Data Manager e o PC para o sistema **cobas®** 5800 serão fornecidos com o sistema.

O software **cobas®** 6800/8800 e o pacote de análise **cobas®** MTB-RIF/INH para utilização nos sistemas **cobas®** 6800/8800 têm que estar instalados no(s) equipamento(s) **cobas®** 6800/8800. O servidor IG (Instrument Gateway) será fornecido com o sistema.

Tabela 11 Equipamentos

Equipamento	P/N
Sistema cobas® 5800	08707464001
Sistema cobas® 6800 (opção móvel)	06379672001
Sistema cobas® 6800 (fixo)	05524245001
Sistema cobas® 8800	05412722001
Módulo de abastecimento de amostras	06301037001

Para informações adicionais, consulte a Assistência ao utilizador e/ou os Guias do utilizador do sistema **cobas®** 5800 ou dos sistemas **cobas®** 6800/8800.

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 ensaio. 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 e uma avaliação adequada dos riscos, conforme descrito em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, no documento M29-A4 do CLSI e no Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual da OMS.¹²⁻¹⁴ Este procedimento só deve ser efetuado por pessoal com experiência no manuseamento de material com risco biológico e na utilização do teste **cobas®** MTB-RIF/INH e sistemas **cobas®** 5800/6800/8800.
- 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.
- Cada laboratório tem de determinar os passos de manuseamento de amostras necessários antes e depois da inativação MIS com base numa avaliação adequada dos riscos e tem de cumprir os regulamentos de biossegurança recomendados, as diretivas ou os regulamentos locais e institucionais.¹⁴
- O êxito da inativação da TB depende do cumprimento dos procedimentos descritos no presente documento e da mistura completa da amostra com a MIS. A liquefação e inativação micobacteriana da amostra pela MIS deve ser executada de acordo com as diretrizes ou regulamentos locais ou institucionais e baseada numa avaliação adequada dos riscos.
- Todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infecciosos e devem ser manipulados com as precauções universais. Se ocorrer derrame, desinfete imediatamente seguindo os procedimentos adequados.
- Se ocorrer derrame de amostras em MIS (que contém tiocianato de guanidina), não deixe que entre em contacto com desinfetantes que contêm hipoclorito de sódio, como a lixívia. Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- Se ocorrer derrame de amostras com MIS, limpe PRIMEIRO com um detergente laboratorial adequado e água e em seguida com etanol a 70%.
- 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 o manuseamento e processamento das amostras, o carryover de amostras não for controlado adequadamente.
- Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (FDS) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- Informe as autoridades competentes locais e o fabricante sobre quaisquer incidentes graves que possam ocorrer ao utilizar este ensaio.

Manuseamento de reagentes

- Para evitar carryover de amostras, reagentes ou controles, manipule todos os reagentes, controles e amostras de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Inspeção 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 derrame, não utilize esse material para testes.
- O **cobas® omni** Lysis Reagent e a MIS contêm tiocianato de guanidina, 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 guanidina, 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 **cobas® MTB-RIF/INH**, o **cobas® MTB-RIF/INH** 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.
- Trate todas as amostras biológicas, incluindo amostras tratadas com MIS, como potenciais agentes infecciosos de acordo com as diretivas ou regulamentos locais e institucionais e/ou com base numa avaliação de riscos adequada.¹⁴

- Use luvas de laboratório, bata de laboratório e proteção ocular e respiratória quando manusear amostras e reagentes de acordo com os procedimentos de segurança das respectivas instituições. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras e controles. Para evitar contaminação, as luvas têm de ser trocadas entre o manuseamento de amostras e o manuseamento do **cobas**® MTB-RIF/INH, **cobas**® MTB-RIF/INH Positive Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit, reagentes **cobas**® **omni** e consumíveis.
- 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 potássio ou de sódio a 0,6% em água desionizada ou destilada. Em seguida esfregue a superfície com um pano com etanol a 70%.
- Se ocorrerem derrames nos sistemas **cobas**® 5800/6800/8800, siga as instruções indicadas na Assistência ao utilizador e/ou do Guia do utilizador dos sistemas **cobas**® 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.

Amostra

Pode ser utilizado com o cobas® MTB-RIF/INH expetoração em bruto e sedimentos de expetoração e de LBA e de expetoração tratados com NALC-NaOH.

Transporte e armazenamento de amostras

As amostras de expetoração em bruto 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 em bruto não tratadas com MIS, recomenda-se temperaturas ≤ -20 °C.

As amostras de sedimentos de expetoração e de LBA tratadas com NALC-NaOH poderão ser armazenadas 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 expetoração e de LBA 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 e agentes etiológicos.

Armazenamento de amostras inativadas

As amostras de expetoração em bruto e de sedimentos de expetoração e de LBA tratadas 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 sistemas cobas® 5800/6800/8800.

Nota: uma amostra tratada com MIS poderá não congelar devido a alto conteúdo de isopropanol.

Nota: o processamento ultrassónico da amostra 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 do procedimento

- Não utilize reagentes do **cobas**® MTB-RIF/INH, do **cobas**® MTB-RIF/INH Positive Control Kit, do **cobas**® Buffer Negative Control Kit, da MIS ou do **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 os Guias do utilizador e/ou de Assistência ao utilizador dos sistemas **cobas**® 5800/6800/8800.
- Certifique-se de que são retiradas as tampas aos tubos de amostra após o processamento por ultrassons e antes do carregamento nos sistemas **cobas**® 5800/6800/8800.
- Para a manutenção adequada dos equipamentos, consulte a Assistência ao utilizador e/ou o Guia do utilizador dos sistemas **cobas**® 5800/6800/8800.

Antes da utilização do **cobas**® MTB-RIF/INH nos sistemas **cobas**® 5800/6800/8800, as amostras devem ser processadas de acordo com as seguintes secções: “Processamento de amostras de expetoração em bruto”, “Processamento de sedimentos de expetoração e de LBA” e “Processamento ultrassónico de amostras”. Fluxos de trabalho representativos abreviados estão resumidos na Tabela 12 para o tipo de amostra de expetoração em bruto e na Tabela 13 para o tipo de amostra de sedimento. Para os detalhes, consulte as secções subsequentes.

Nota: o manuseamento de amostras antes e depois da inativação **cobas**® MIS deve ser realizado de acordo com as diretivas ou os regulamentos locais e institucionais e/ou com base numa avaliação de riscos adequada.¹⁴

Nota: o processamento ultrassónico de amostras tratadas com MIS deve ser executado de acordo com as diretivas ou os regulamentos locais ou institucionais e baseada numa avaliação adequada dos riscos.¹⁴

Tabela 12 Panorâmica de fluxo de trabalho – tipo de amostra de expetoração em bruto

1				Adicione 2 partes de MIS a 1 parte de expetoração em bruto
2		30 a 60 segundos		Agite vigorosamente ou misture em vórtex 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		Agite vigorosamente ou misture em vórtex 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
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 × g
8				Carregue a amostra sem tampa nos sistemas cobas ® 5800 ou cobas ® 6800/8800 e inicie a corrida com o tipo de amostra de expetoração em bruto

Tabela 13 Panorâmica de fluxo de trabalho – tipo de amostra de sedimento

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 • 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	Agite vigorosamente ou misture em vórtex 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	Agite vigorosamente ou misture em vórtex durante 30 a 60 segundos
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 × g
8			Carregue a amostra sem tampa nos sistemas cobas® 5800 ou cobas® 6800/8800 e inicie a corrida com o tipo de amostra de sedimento

Processamento de amostras de expetoração em bruto

- Confirme que o reservatório da expetoração em bruto 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 reservatório com a expetoração e adicione aproximadamente 2 partes de MIS a 1 parte de amostra de expetoração (p. 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.
- Agite vigorosamente ou misture em vórtex 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.

- Agite vigorosamente ou misture em vórtex 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 × 13 mm, com tampa de enroscar e etiqueta de código de barras termooestável (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 reservatório de expetoração correspondem ao do tubo secundário de 5 ml.

Nota: consulte a Tabela 14.

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

Processamento de sedimentos de expetoração e de LBA

- Confirme que o recipiente com sedimentos de expetoração e de LBA 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 em vórtex 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 × 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 reservatório da 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 14.

- Feche os frascos de MIS imediatamente após terem sido usados.
- Agite vigorosamente ou misture em vórtex 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.

- Agite vigorosamente ou misture em vórtex 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-RIF/INH.

Tabela 14 Requisitos de volume de amostra tratada com cobas® Microbial Inactivation Solution para executar o cobas® MTB-RIF/INH

Número de testes a executar a partir do tubo secundário	Volume mínimo necessário de amostra tratada com MIS	Volume máximo necessário 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® 5800/6800/8800 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-RIF/INH 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 dispositivo de processamento ultrassónico 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 termoestável.

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 termoestável.

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



- Inicie o dispositivo de processamento ultrassónico de tubos.
- Selecione o perfil predefinido de processamento ultrassónico “Amostras respiratórias”.
- Abra o dispositivo de processamento ultrassónico de tubos e insira a rack MPA de acordo com as instruções do fabricante.
- Feche o dispositivo de processamento ultrassónico de tubos.
- Inicie a corrida de processamento ultrassónico.
- Confirme que a corrida de processamento ultrassónico foi bem sucedida e retire a rack MPA.

Nota: prevê-se que os tubos de amostra aqueçam durante a corrida de processamento ultrassónico. Tenha cuidado quando retirar a rack MPA com os tubos de amostra.

Nota: em caso de falha do processamento ultrassónico, consulte as instruções do fabricante, corrija a causa e repita a corrida de processamento ultrassónico, depois de deixar as amostras arrefecer durante pelo menos 15 minutos.

- Uma amostra tratada com MIS e processada com ultrassons pode agora ser executada com o **cobas®** MTB-RIF/INH ou pode ser armazenada de acordo com a secção “Armazenamento de amostras inativadas”.

Execução do cobas® MTB-RIF/INH no sistema cobas® 5800

O **cobas®** MTB-RIF/INH pode ser executado com um volume de amostra mínimo de 1,2 ml dos quais 850 µl são processados. O procedimento de teste é descrito detalhadamente nos Guias do utilizador e de Assistência ao utilizador do sistema **cobas®** 5800. A Figura 2 a seguir resume o procedimento.

- Antes de retirar a tampa aos tubos para introduzir as amostras no sistema **cobas®** 5800, recomenda-se sedimentar os detritos celulares e de matriz por centrifugação da amostra durante um máximo de 1 minuto a um RCF máximo de $3000 \times g$.
- Uma só corrida pode ter uma combinação de amostras (expetoração em bruto, sedimento).

Nota: misture as amostras em vórtex durante um mínimo de 10 segundos se as amostras tiverem estado armazenadas durante mais de 1 hora depois do processamento ultrassónico e antes da centrifugação.

Nota: a omissão do passo de centrifugação poderá causar um aumento da taxa de coágulos de amostra no sistema cobas® 5800.

Figura 2 Procedimento do teste cobas® MTB-RIF/INH no sistema cobas® 5800

1	Iniciar sessão no sistema
2	Carregar amostras no sistema - Retirar as tampas dos tubos - Colocar o tubo diretamente na rack - Carregar racks de amostras no sistema - O sistema prepara automaticamente - Pedir testes - Selecionar “Raw sputum” (Expetoração em bruto) para pedir amostras de expetoração em bruto tratadas com MIS - Selecionar “Sediment” (Sedimento) para pedir amostras de sedimentos de LBA/expetoração tratadas com MIS
3	Reabastecer reagentes e consumíveis conforme solicitado pelo sistema - Carregar a(s) cassete(s) de reagente específica(s) do teste - Carregar mini racks de controlo - Carregar pontas de processamento - Carregar pontas de eluição - Carregar placas de processamento - Carregar placas de resíduos líquidos - Carregar placas de amplificação - Carregar cassete com MGP - Reabastecer diluente de amostras - Reabastecer reagente de lise - Reabastecer reagente de lavagem
4	Inicie a corrida premindo o botão de iniciar processamento na interface de utilizador; todas as corridas subsequentes iniciarão automaticamente se não forem adiadas manualmente
5	Rever e exportar os resultados
6	Retirar e colocar a tampa nos tubos de amostra que cumprem os requisitos mínimos de volume se necessário para utilização futura Limpar o equipamento - Descarregar mini racks de controlo vazias - Descarregar a(s) cassete(s) de reagente específica(s) do teste - Esvaziar gaveta de placas de amplificação já utilizadas - Esvaziar o reservatório de resíduos líquidos - Esvaziar o reservatório de resíduos sólidos

Execução do cobas® MTB-RIF/INH nos sistemas cobas® 6800/8800

O cobas® MTB-RIF/INH pode ser executado com um volume de amostra necessário mínimo de 1,2 ml dos quais 850 µl são processados. A operação do equipamento está descrita detalhadamente no Guia do utilizador e/ou na Assistência ao utilizador dos sistemas cobas® 6800/8800. A Figura 3 a seguir resume o procedimento.

- Antes de retirar a tampa aos tubos para introduzir as amostras nos sistemas cobas® 6800/8800, 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 × g.
- Uma só corrida pode ter uma combinação de amostras (expetoração em bruto, sedimento).

Nota: misture as amostras em vórtex durante um mínimo de 10 segundos se as amostras tiverem estado armazenadas durante mais de 1 hora depois do processamento ultrassónico e antes da centrifugação.

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

Figura 3 Procedimento do teste cobas® MTB-RIF/INH nos sistemas cobas® 6800/8800

1	Iniciar sessão no sistema Prima “Iniciar” para preparar o sistema Pedir testes • Selecionar “Raw sputum” (Expetoração em bruto) para pedir amostras de expetoração em bruto tratadas com MIS • Selecionar “Sediment” (Sedimento) para pedir amostras de sedimentos de LBA/expetoração tratadas com MIS
2	Reabastecer reagentes e consumíveis conforme solicitado pelo sistema • Carregar a cassete de reagente específica do teste • Carregar 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	Colocar amostras no sistema • Para cada amostra ○ Retirar a tampa do tubo ○ Colocar o tubo na rack • Colocar a rack de amostras e as racks para pontas obstruídas no módulo de abastecimento de amostras • Confirmar que as amostras foram aceites no módulo de transferência
4	Inicie a corrida
5	Rever e exportar os resultados
6	Retirar e colocar a tampa nos tubos de amostra que cumprem os requisitos mínimos de volume se necessário para utilização futura Limpar o equipamento • Descarregar cassetes de controlo vazias • Esvaziar gaveta de placas de amplificação já utilizadas • Esvaziar o reservatório de resíduos líquidos • Esvaziar o reservatório de resíduos sólidos

Resultados

O **cobas**® MTB-RIF/INH deteta automaticamente mutações associadas a resistência à rifampicina e mutações associadas a resistência à isoniazida de amostras e controlos, e indica a validade do teste, assim como os resultados alvo individuais.

Controlo de qualidade e validade dos resultados no sistema **cobas**® 5800

- Pelo menos de 72 em 72 horas, e com cada novo lote de kit, são processados um controlo negativo [(-) Ctrl] e um controlo positivo [MTB-RIF/INH (+) C]. Os controlos positivo e/ou negativo podem ser programados mais frequentemente com base nos regulamentos locais e/ou nos procedimentos do laboratório.
- No relatório e/ou no **cobas**® 5800 software, verifique os alarmes e os respetivos resultados associados, para se certificar da validade do resultado.

A invalidação dos resultados é feita automaticamente pelo **cobas**® 5800 software, com base na falha de algum controlo positivo ou negativo.

NOTA: o sistema **cobas**® 5800 é fornecido com a predefinição de executar conjunto de controlos (positivo e negativo) com cada corrida, mas pode ser configurado para uma programação menos frequente para até cada 72 horas com base nos regulamentos locais e/ou nos procedimentos do laboratório. Para mais informações, contacte o seu técnico de assistência Roche e/ou o serviço de apoio ao cliente da Roche.

Resultados de controlo no sistema **cobas**® 5800

Os resultados dos controlos estão indicados no software do **cobas**® 5800 na aplicação “Controlos”.

- Os controlos estão assinalados com um “Válido” na coluna “Resultado de controlo” se todos os alvos do controlo forem considerados válidos. Os controlos estão assinalados com um “Inválido” na coluna “Resultado de controlo” se um ou todos os alvos do controlo forem considerados inválidos.
- Os controlos assinalados com um “Inválido” apresentam um alarme na coluna “Alarmes”. Na vista de detalhes, são apresentadas mais informações sobre o motivo pelo qual o controlo é mostrado como inválido, incluindo informações sobre o alarme.
- Se um dos controlos for inválido, é necessário repetir todos os controlos e todas as amostras associadas ao teste.

Controlo de qualidade e validade dos resultados nos sistemas **cobas**® 6800/8800

- Em cada batch, independentemente do tipo de resultado solicitado, são processados um controlo negativo [(-) Ctrl] e um controlo positivo [MTB-RIF/INH (+) 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 sistemas **cobas**® 6800/8800.
- O batch é válido se não aparecer nenhum alarme para nenhum dos controlos. Se o batch for inválido, repita os testes de todo o batch.

A validação dos resultados é feita automaticamente pelo software dos sistemas cobas® 6800/8800, com base no desempenho do controlo positivo e negativo.

Interpretação dos resultados

Tabela 15 Resultados e interpretação do cobas® MTB-RIF/INH

Alvo 1	Alvo 2	Alvo 3	Alvo 4	Interpretação
INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Negative	O resultado de INH é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência à RIF.
INH Negative	RIF 1 Positive	RIF 2 Negative	RIF 3 Negative	O resultado de INH é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Negative	RIF 1 Negative	RIF 2 Positive	RIF 3 Negative	O resultado de INH é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Negative	RIF 1 Negative	RIF 2 Negative	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Negative	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Negative	O resultado de INH é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Negative	RIF 1 Positive	RIF 2 Negative	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Negative	RIF 1 Negative	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Negative	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Negative	RIF 2 Negative	RIF 3 Negative	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Não detetadas mutações associadas a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Negative	RIF 3 Negative	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	Invalid	Invalid	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.

Alvo 1	Alvo 2	Alvo 3	Alvo 4	Interpretação
INH Positive	RIF 1 Negative	RIF 2 Positive	RIF 3 Negative	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	Invalid	RIF 2 Positive	Invalid	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Negative	RIF 2 Negative	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	Invalid	Invalid	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Negative	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	Invalid	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Negative	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	Invalid	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Negative	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	Invalid	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	Invalid	Invalid	Invalid	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima.
Invalid	RIF 1 Positive	Invalid	Invalid	O resultado de INH é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
Invalid	Invalid	RIF 2 Positive	Invalid	O resultado de INH é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.

Alvo 1	Alvo 2	Alvo 3	Alvo 4	Interpretação
Invalid	Invalid	Invalid	RIF 3 Positive	O resultado de INH é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
Invalid	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	Invalid	O resultado de INH é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
Invalid	RIF 1 Positive	Invalid	RIF 3 Positive	O resultado de INH é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
Invalid	Invalid	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	O resultado de INH é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
Invalid	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	O resultado de INH é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
INH Positive	RIF 1 Negative	Invalid	RIF 3 Positive	O resultado de INH é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência a INH. O resultado de RIF é válido. Detetada mutação ou mutações associada(s) a resistência à RIF.
Invalid	Invalid	Invalid	Invalid	O resultado de INH é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima. O resultado de RIF é inválido. Consulte as instruções mencionadas acima.

Interpretação dos resultados no sistema cobas® 5800

Os resultados das amostras estão indicados no software do **cobas® 5800** na app “Resultados”.

Para um batch de controlo válido, verifique todas as amostras individuais relativamente a alarmes no software do **cobas® 5800** e/ou nos relatórios. A interpretação do resultado deverá ser como se segue:

- As amostras associadas ao batch de controlo válido são indicados como “Válido” na coluna “Resultado de controlo” se todos os Resultados dos alvos de controlo forem reportados como válidos. As amostras associadas ao batch de controlo falhado são indicados como “Inválido” na coluna “Resultado de controlo” se todos os Resultados dos alvos de controlo forem reportados como inválidos.
- Se os controlos associados a um resultado da amostra forem inválidos, será adicionado um alarme específico ao resultado da amostra como se segue:
 - Q05D: falha de validação de resultado, devido a um controlo positivo inválido
 - Q06D: falha de validação de resultado, devido a um controlo negativo inválido
- Os valores na coluna “Resultados” para o resultado do alvo de amostra individual devem ser interpretados como indicado na Tabela 15 acima.

Se um ou mais alvos de amostra estiverem marcados com “Inválido”, o software **cobas® 5800** indica um alarme na coluna “Alarmes”. Na vista de detalhes, são apresentadas mais informações sobre o motivo pelo qual o(s) alvos de amostra é(ão) mostrado(s) como inválido, incluindo informações sobre o alarme.

Figura 4 Exemplo de resultados do **cobas® MTB-RIF/INH** no sistema **cobas® 5800**

ID da amostra	Teste	Resultado de controlo	Alarme	Estado	Resultado				Data/hora de criação
MRI_RS_inv-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Invalid	RIF1 Invalid	RIF2 Invalid	RIF3 Invalid	7/1/2022 11:45:19 AM
MRI_RS_neg-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Negative	7/1/2022 11:45:20 AM
MRI_RS_neg-02	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Negative	7/1/2022 11:45:20 AM
MRI_RS_pos-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Positive (Ct 41.56)	RIF1 Positive (Ct 40.12)	RIF2 Positive (Ct 41.08)	RIF3 Positive (Ct 40.38)	7/1/2022 11:45:18 AM
MRI_RS_pos-02	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Positive (Ct 40.22)	RIF1 Positive (Ct 42.00)	RIF2 Positive (Ct 42.78)	RIF3 Positive (Ct 42.77)	7/1/2022 11:45:19 AM
MRI_S_inv-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Invalid	RIF1 Invalid	RIF2 Invalid	RIF3 Invalid	7/1/2022 11:45:18 AM
MRI_S_neg-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	INH Negative	7/1/2022 11:45:18 AM

Interpretação dos resultados nos sistemas cobas® 6800/8800

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

- Um batch válido pode incluir resultados de amostra válidos e inválidos.
- As colunas “Válido” e “Resultado geral” não são aplicáveis (NA) a resultados de amostras do cobas® MTB-RIF/INH 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 resultado do alvo.
- Os resultados do alvo indicados para cada amostra são válidos salvo se indicados como “Invalid” na coluna de resultado do alvo individual. Tenha em atenção que os resultados de mutações associadas a resistência à rifampicina (RIF) podem conter um ou dois resultados alvo individuais inválidos, conforme indicado na Tabela 15.
- Pode estar presente e ser detetada mais de uma mutação associada a resistência à RIF em um dos canais de deteção da RIF (Alvo 2, Alvo 3, Alvo 4). O cobas® MTB-RIF/INH não discrimina as mutações específicas associadas a resistência à RIF.
- Pode estar presente e ser detetada mais de uma mutação associada a resistência a INH no canal de deteção de INH (Alvo 1). O cobas® MTB-RIF/INH não discrimina as mutações específicas associadas a resistência a INH.
- O cobas® MTB-RIF/INH é um teste reflexo do cobas® MTB e portanto baseia-se na deteção de ADN do complexo MTB de wild-type para monitorizar todo o processo de preparação de amostras e amplificação por PCR. O cobas® MTB distingue-se do cobas® MTB-RIF/INH na sua maior sensibilidade para a deteção de ADN do complexo MTB devido a uma abordagem de alvo duplo, com um alvo a estar presente em várias cópias genómicas. Por conseguinte, nalguns casos, quando não são detetadas nem a MTB nem as respetivas mutações associadas a resistência, a presença ou ausência de mutações associadas a resistência não pode ser determinada pelo cobas® MTB-RIF/INH (resultado “Invalid” na respetiva coluna Resultado alvo, Tabela 15). Se isto ocorrer:
 - Verifique os alarmes associados. Os alarmes “C02H1-H5” são indicativos de insuficiente ADN do complexo MTB, na ausência de outros alarmes.
 - Teste novamente a amostra inativada, se estiver disponível volume suficiente de acordo com a Tabela 14 e se a amostra inativada tiver sido armazenada de acordo com a secção “Armazenamento de amostras inativadas”; caso contrário, repita o teste utilizando uma nova amostra fresca.
 - Considere enriquecer a carga bacteriana da *M. tuberculosis* por expansão da cultura ou utilizando métodos alternativos se forem observados resultados inválidos repetidamente do mesmo paciente.
- 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 15 apresenta os resultados e as respetivas interpretações da deteção de mutações associadas a resistência à rifampicina e à isoniazida.

Figura 5 Exemplo dos resultados do **cobas®** MTB-RIF/INH nos sistemas **cobas®** 6800/8800

Teste	ID da amostra	Válido	Alarmes	Tipo de amostra	Resultado global	Alvo 1	Alvo 2	Alvo 3	Alvo 4
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_R_0001	NA		Raw Sputum	NA	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Positive	RIF3 Negative
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_R_0002	NA		Raw Sputum	NA	INH Positive	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Positive
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_R_0003	NA	P02T	Raw Sputum	NA	Invalid	Invalid	Invalid	Invalid
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_S_0001	NA		Sediment	NA	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Positive	RIF3 Negative
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_S_0002	NA		Sediment	NA	INH Positive	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Positive
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_S_0003	NA	C02H1	Sediment	NA	Invalid	Invalid	Invalid	Invalid
MTB-RIF/INH 850 µL	C161420284090428828404	Yes		(-) Ctrl	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid
MTB-RIF/INH 850 µL	C161420284093009580264	Yes		MTB-RIF/INH (+) C	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid

Limitações do procedimento

- O **cobas®** MTB-RIF/INH deve ser sempre executado juntamente com testes de suscetibilidade a fármacos a culturas micobacterianas e um teste reflexo juntamente com o **cobas®** MTB (amostras determinadas positivas com o **cobas®** MTB), para minimizar o risco de falsos positivos, falsos negativos e/ou resultados inválidos. O desempenho do **cobas®** MTB-RIF/INH foi validado para expetoração em bruto e para sedimentos de expetoração e 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-RIF/INH foi validado para utilização com amostras de expetoração em bruto e de sedimentos de expetoração e de LBA 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 MIS. A liquefação e inativação micobacteriana da amostra pela MIS deve ser executada de acordo com as diretrizes ou regulamentos locais ou institucionais e baseada numa avaliação adequada dos riscos.
- Exceder os limites de volume e/ou não seguir os passos dos procedimentos descritos nas secções “Processamento de amostras de expetoração em bruto”, “Processamento de sedimentos de expetoração e de LBA” 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 dos organismos.
- O sucesso ou fracasso terapêutico do regime antituberculoso 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 sistemas **cobas**® 5800/6800/8800.
- O **cobas**® MTB-RIF/INH foi avaliado apenas para utilização em combinação com o **cobas**® MTB-RIF/INH 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 sistemas **cobas**® 5800/6800/8800, 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.
- **cobas**® MTB-RIF/INH não é indicado para ser utilizado com amostras respiratórias como um teste para a cura.
- O **cobas**® MTB-RIF/INH não distingue entre as várias espécies do complexo MTB.
- A deteção de mutações associadas a resistência à rifampicina e de mutações associadas a resistência à isoniazida depende do número de microrganismos do complexo MTB 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 pela MTB e também pelo HIV, existe uma maior probabilidade das amostras serem negativas na análise de esfregaços e portanto terem o 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, sintomas clínicos e outros resultados de testes laboratoriais e de radiologia.
- Podem registar-se resultados falsos negativos ou inválidos devido a inibição da polimerase. A deteção de ADN inerente do complexo MTB na amostra está incluída na conceção do **cobas**® MTB-RIF/INH como um controlo interno para garantir que as amostras contêm suficiente ADN do complexo MTB.
- A adição de enzima AmpErase ao reagente de mistura principal do **cobas**® MTB-RIF/INH 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 raramente, poderão não ser detetadas mutações associadas a resistência se outras mutações estiverem presentes na sua proximidade.
- 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 10, tem de ser verificada pelo utilizador antes da implementação do fluxo de trabalho do **cobas®** MTB-RIF/INH 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 10, tem de ser verificada pelo utilizador antes da implementação do fluxo de trabalho do **cobas®** MTB-RIF/INH no laboratório. A utilização de outros tipos de códigos de barras pode causar danos no código de barras.

Avaliação do desempenho

Características dos desempenhos principais executados nos sistemas **cobas® 6800/8800**

Inativação de amostras

Foi avaliada a redução do risco de infeção 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 $3000 \times g$, 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-RIF/INH foi determinado por análise de diluições em série de 1 estirpe mutante do complexo MTB, portadora da mutação mais prevalente associada a resistência à rifampicina, a S531L (gene *rpoB*) e da mutação mais prevalente associada a resistência à isoniazida, a S315T (gene *katG*), em duas matrizes clínicas negativas em pool – expetoração em bruto e sedimentos de expetoração/LBA. Foram testados painéis de 10 a 11 níveis de concentração e ainda um branco para um total de 72 réplicas por nível de concentração e tipo de amostra, utilizando 3 lotes de reagentes do teste **cobas®** MTB-RIF/INH, através de várias corridas em diferentes dias e com diferentes operadores e equipamentos.

O LoD para a deteção da *M. tuberculosis* resistente à RIF variou entre 94,0 CFU/ml (sedimentos de expetoração/LBA) e 182 CFU/ml (expetoração em bruto).

O LoD para a deteção da *M. tuberculosis* resistente a INH variou entre 12,6 CFU/ml (sedimentos de expetoração/LBA) e 27,5 CFU/ml (expetoração em bruto).

Heterorresistência

A capacidade de detetar MTB mutante numa infeção mista com MTB de wild-type, foi confirmada testando diferentes rácios de wild-type em mutantes. Em amostras de expetoração em bruto e de sedimentos de expetoração e de LBA, o cobas® MTB-RIF/INH, deteta baixos níveis de concentração de isolados em cultura MDR MTB ($\sim 3 \times \text{LoD}$) num fundo de até 60% MTB de wild-type.

Inclusividade das mutações associadas a resistência

Foi verificada a inclusividade das mutações associadas a resistência à rifampicina do gene *rpoB* e das mutações associadas a resistência à isoniazida da região promotora do gene *katG* e gene *inhA* em microrganismos do complexo MTB, testando os stocks de culturas e estirpes do complexo MTB resistentes à rifampicin e/ou à isoniazida portadoras das seguintes 23 mutações:

- Mutações associadas a resistência à rifampicina fenotípica do gene *rpoB*:
 - L511P
 - Q513K, Q513L, Q513P
 - D516V, D516Y
 - S522L, S522Q
 - H526D, H526L, H526N, H526R, H526Y
 - S531L, S531W
 - L533P
- Mutações associadas a resistência à isoniazida fenotípica da região promotora do gene *katG* e do gene *inhA*:
 - Gene *katG*:
 - S315I, S315N, S315T, S315T2
 - Região promotora do gene *inhA*:
 - T-8A, T-8C
 - C-15T

Todas as mutações foram detetadas a 545 CFU/ml em expetoração em bruto e a 282 CFU/ml em amostras de sedimentos de expetoração e de LBA.

A inclusividade de mais 2 mutações (S522W e D516G) associadas a resistência à rifampicina do gene *rpoB* foi verificada por testes a plasmídeos, tendo sido ambas detetadas a 77 cópias/ml.

Especificidade do complexo MTB de wild-type

A especificidade analítica do complexo MTB de wild-type foi verificada testando 13 estirpes de MTB a altos níveis de concentração ($\sim 1,00 \times 10^4$ CFU/ml) em expetoração em bruto e sedimentos de expetoração e de LBA, e nas seguintes estirpes do complexo MTB a níveis baixos de concentração ($\sim 3 \times \text{LoD}$) em sedimentos:

- *M. tuberculosis* (H37 ATCC® 25177™)
- *M. bovis* BCG (sub-estripe Tóquio 172 NIBSC 07/272 OMS e sub-estripe Moscovo NIBSC 07/274 OMS)
- *M. africanum* (ATCC® 25420™)
- *M. bovis* subespécie *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™)

Todas as estirpes de wild-type geraram resultados negativos válidos para a RIF e INH.

Precisão

A precisão interna foi examinada utilizando um painel composto de uma estirpe do complexo MTB mutante em cultura, portadora da mutação mais prevalente associada a resistência à rifampicina, a S531L (gene *rpoB*) e da mutação mais prevalente associada a resistência à isoniazida, a S315T (gene *katG*), diluído em duas matrizes clínicas negativas em pool – expetoração em bruto e sedimentos de expetoração/LBA. Foram examinadas fontes de variabilidade com painéis constituídos por 3 níveis de concentração (incluindo o branco), utilizando 3 lotes de reagentes do cobas® MTB-RIF/INH e 2 equipamentos ao longo de um período de tempo de 12 dias e com um total de 24 corridas. A Tabela 16 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 da percentagem do coeficiente de variação dos valores de Ct dos testes, efetuada nos membros do painel positivo (ver Tabela 17), produziu intervalos globais de CV (%) que variavam entre 1,8% e 2,7% para a deteção de mutações associadas a resistência a INH e entre 1,5% e 2,1% para a deteção de mutações associadas a resistência à RIF.

Tabela 16 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
M. tuberculosis – expetoração em bruto para alvo RIF					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
182 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
545 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%

Concentração do alvo	N.º de testados	N.º de positivos	Taxa de positividade	Intervalo de confiança de 95%	
				Limite inferior	Limite superior
M. tuberculosis – sedimentos para alvo RIF					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
94,0 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
282 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
M. tuberculosis – expetoração em bruto para alvo INH					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
27,5 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
82,5 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
M. tuberculosis – sedimentos para alvo INH					
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
12,6 CFU/ml	48	47	97,9%	88,9%	99,9%
37,8 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%

Tabela 17 Média geral, desvios padrão e coeficientes de variação (%) para o limiar do ciclo nos painéis positivos para MTBC

Concentração do alvo	Taxa de positividade de	Ct médio	Dentro da corrida		Entre corridas		Entre dias		Entre equipamentos		Entre lotes		Total	
			DP	CV%	DP	CV%	DP	CV%	DP	CV%	DP	CV%	DP	CV%
M. tuberculosis – expetoração em bruto para alvo RIF														
182 CFU/ml	100%	37,3	0,48	1,3	0,00	0,0	0,00	0,0	0,34	0,9	0,00	0,0	0,59	1,6
545 CFU/ml	100%	35,6	0,40	1,1	0,00	0,0	0,29	0,8	0,00	0,0	0,24	0,7	0,55	1,5
M. tuberculosis – sedimentos para alvo RIF														
94,0 CFU/ml	100%	39,3	0,36	0,9	0,14	0,3	0,45	1,1	0,00	0,0	0,42	1,1	0,72	1,8
282 CFU/ml	100%	38,0	0,40	1,0	0,12	0,3	0,54	1,4	0,41	1,1	0,00	0,0	0,80	2,1
M. tuberculosis – expetoração em bruto para alvo INH														
27,5 CFU/ml	100%	37,5	0,74	2,0	0,00	0,0	0,31	0,8	0,17	0,5	0,00	0,0	0,82	2,2
82,5 CFU/ml	100%	35,9	0,52	1,5	0,00	0,0	0,43	1,2	0,31	0,9	0,00	0,0	0,74	2,1
M. tuberculosis – sedimentos para alvo INH														
12,6 CFU/ml	97,9%	39,4	0,75	1,9	0,66	1,7	0,00	0,0	0,34	0,9	0,00	0,0	1,06	2,7
37,8 CFU/ml	100%	37,5	0,56	1,5	0,00	0,0	0,00	0,0	0,31	0,8	0,15	0,4	0,66	1,8

Especificidade analítica/reatividade cruzada

Para avaliar a especificidade analítica e a capacidade de detetar concentrações baixas de mutante e MTB de wild-type na presença de outros organismos, foi testado com o cobas® MTB-RIF/INH um painel de 145 bactérias, fungos e vírus, incluindo os normalmente encontrados no trato respiratório. Os microrganismos indicados na Tabela 18 foram adicionados a concentrações de aproximadamente 1×10^6 unidades/ml para bactérias e de aproximadamente 1×10^5 unidades/ml para os vírus. Foram executados testes com cada microrganismo potencialmente interferente na ausência e na presença do mutante alvo de complexo MTB (adicionado a 282 CFU/ml) e do wild-type alvo do complexo

MTB (adicionado a 200 CFU/ml). Nenhum dos microrganismos interferiu com o desempenho do teste gerando resultados falsos positivos. A detecção de baixas concentrações do mutante alvo do complexo MTB não foi afetada pelos microrganismos testados, exceto os *M. asiaticum*, *M. fuerth*, *M. intermedium*, *M. marseillense*, *M. peregrinum* e *M. szulgai* a níveis de concentração $> 1 \times 10^5$ CFU/ml e o *M. chubuense* a níveis de concentração $> 1 \times 10^4$ CFU/ml. A detecção de baixas concentrações do wild-type alvo do complexo MTB não foi afetada pelos microrganismos testados, exceto os *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. colombiense*, *M. gastri*, *M. lentiflavum* e *M. marinum* a níveis de concentração $> 1 \times 10^5$ CFU/ml e os *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. bouchardurhonense* e *M. vulneris* a níveis de concentração $> 1 \times 10^4$ CFU/ml. Foi avaliada *in silico* a potencial reatividade cruzada do *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium mantenii* 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-RIF/INH.

Tabela 18 Microrganismos testados relativamente a especificidade analítica/reatividade cruzada

Microrganismo	Concentração	Microrganismo	Concentração
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium gordonae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	8,5E+05 CFU/ml	<i>Mycobacterium holsaticum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Adenovírus</i>	1,0E+05 cp/ml	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intermedium</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Bacillus cereus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> subespécie <i>subtilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bactericides fragilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kumamontense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium malmoeense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida albicans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marinum</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Candida glabrata</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marseillense</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Candida krusei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida tropicalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium nonchromogeiicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	1,0E+06 IFU/ml	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Citrobacter freundii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium simiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium szulgai</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium terrae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Eikenella corrodens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium triviale</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vaccae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i> subespécie <i>cloacae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vulneris</i>	1,0E+04 CFU/ml*
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium xenopi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium yongonense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,0E+06 ccu/ml
<i>Escherichia coli</i> produtora de CTX-M-15 ESBL	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subespécie <i>nucleatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria lactamica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1,0E+06 CFU/ml

Microrganismo	Concentração	Microrganismo	Concentração
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria mucosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria sicca</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus da imunodeficiência humana	1,0E+05 cp/ml	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1,0E+06 geq/ml
Vírus da gripe A humana	1,0E+05 U/ml	<i>Nocardia farcinica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus da gripe B humana	1,0E+05 U/ml	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	1,0E+06 CFU/ml
Metapneumovírus humano	1,0E+05 U/ml	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,0E+06 geq/ml
Parainfluenza humano tipo 1	1,0E+05 U/ml	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,0E+06 CFU/ml
Parainfluenza humano tipo 2	1,0E+05 U/ml	<i>Penicillium</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
Parainfluenza humano tipo 3	1,0E+05 U/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,0E+06 CFU/ml
Parainfluenza humano tipo 4	1,0E+05 U/ml	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus sincicial respiratório humano de Tipo A	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1,0E+06 CFU/ml
Vírus sincicial respiratório humano de Tipo B	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1,0E+06 CFU/ml
Rinovírus humano	1,0E+05 U/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Kingella kingae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Rhizopus</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Rhodococcus equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC-3 carbapenemase	1,0E+06 CFU/ml	Vírus da rubéola (sarampo alemão)	1,0E+05 U/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subespécie <i>pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml	Vírus da rubéola	1,0E+05 U/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Rubulavírus</i>	1,0E+05 U/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Scedosporium</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella micdadei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Serratia marcescens</i> subespécie <i>marcescens</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella pneumophila</i> subespécie <i>pneumophila</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> subespécie <i>aureus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subespécie <i>mesenteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium arosiense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptococcus constellatus</i> subespécie <i>constellatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>avium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus equi</i> subespécie <i>equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>hominissuis</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptococcus mitis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>silvaticum</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptococcus mutans</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i>	1,0E+04 CFU/ml*	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium bouchardurhonense</i>	1,0E+04 CFU/ml*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium celatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus salivarius</i> subespécie <i>salivarius</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chimaera</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chubuense</i>	1,0E+04 CFU/ml*	<i>Streptococcus uberis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium colombiense</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptomyces anulatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium confluentis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Tsukamurella</i> spp.	1,0E+06 geq/ml
<i>Mycobacterium flavescens</i>	1,0E+06 CFU/ml	Vírus da varicela-zoster	1,0E+05 cp/ml
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Veillonella atypica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium fuerth</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Veillonella parvula</i>	1,0E+06 CFU/ml

Microrganismo	Concentração	Microrganismo	Concentração
<i>Mycobacterium gastri</i>	1,0E+05 CFU/ml*	-	-

* Nível a que não foi observada nenhuma interferência com a detecção de *M. tuberculosis*, testado também a 1,0E+06 CFU/ml, que mostrou interferência.

Interferência

Foi avaliado o efeito de substâncias exógenas que podem ser segregadas em amostras respiratórias (Tabela 19). Foram testadas todas as substâncias potencialmente interferentes a níveis iguais ou acima dos clinicamente relevantes em amostras de expetoração na ausência e na presença do mutante alvo do complexo MTB (adicionado a 545 CFU/ml) e do wild-type alvo do complexo MTB de (adicionado a 200 CFU/ml).

Nenhuma das substâncias interferiu com o desempenho do teste gerando resultados falsos negativos ou falsos positivos. Nenhuma das substâncias interferiu com o desempenho do teste gerando resultados falsos negativos/não notificáveis, exceto a petasina a níveis de concentração > 25 mg/ml.

Tabela 19 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 pg/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	25 mg/ml*	Moxifloxacina	15 µg/ml
Capreomicina	80 µg/ml	Mupirocina	0,05% (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 pg/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	Estreptomicina	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	2,5 mg/ml	Tobramicina	24,1 µg/ml
Isoniazida	50 µg/ml	Zanamivir	0,1 mg/ml

* O nível mais elevado ao qual não foi observada nenhuma interferência.

Foram testadas, relativamente a interferência, substâncias endógenas que podem estar presentes 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 do mutante alvo do complexo MTB (adicionado a uma concentração de até 545 CFU/ml) e do wild-type alvo do complexo MTB (adicionado a 200 CFU/ml).

Nenhuma das substâncias interferiu com o desempenho do teste gerando resultados falsos negativos, falsos positivos ou inválidos/não notificáveis.

Tabela 20 Lista de substâncias endógenas testadas relativamente a interferência

Substância	Concentração	Substância	Concentração
Suco gástrico	10% (v/v)	Mucina	5% (p/v)
Hemoglobina	2 g/l	Pus	5% (v/v)
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 com uma estirpe mutante do complexo MTB, portadora da mutação mais prevalente associada a resistência à rifampicina, a S531L (gene *rpoB*) e da mutação mais prevalente associada a resistência à isoniazida, a S315T (gene *katG* gene), a uma concentração de aproximadamente $3 \times \text{LoD}$ do cobas® MTB-RIF/INH na respetiva matriz. Todas as 100 réplicas testadas por tipo de amostra eram válidas e positivas para o complexo MTB, originando uma taxa de falha do sistema global de 0,0%, com um intervalo de confiança superior unilateral de 95% de 3,0%.

Contaminação cruzada

A taxa de contaminação cruzada de amostra para amostra foi determinada como sendo 0,0% (0/240) ao serem testadas alternadamente com o cobas® MTB, amostras wild-type de MTB altamente positivas e amostras 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-RIF/INH com amostras clínicas, testando amostras colhidas prospectivamente e arquivadas (expetoração em bruto e sedimentos de expetoração processados com NaOH-NALC) de sujeitos com o mínimo de 18 anos, com presumível TB colhidas no Peru, Ucrânia, Rússia, África do Sul e Uganda. Foram efetuados testes de comparação lado a lado com o ensaio Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance.

Os resultados são exibidos na Tabela 21 e na Tabela 22.

Tabela 21 Sensibilidade e especificidade do cobas® MTB-RIF/INH utilizando amostras clínicas – resistência à RIF

		Roche cobas® MTB-RIF/INH	Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance
Sensibilidade	Expetoração em bruto	116/120 96,7% [91,7-99,1%]	115/120 95,8% [90,5-98,6%]
Sensibilidade	Sedimento	23/23 100% [85,2-100%]	23/23 100% [85,2-100%]
Sensibilidade	Combinado	139/143 97,2% [93,0-99,2%]	138/143 96,5% [92,0-98,9%]
Especificidade	Expetoração em bruto	331/338 97,9% [95,8-99,2%]	329/338 97,3% [95,0-98,8%]
Especificidade	Sedimento	219/220 99,5% [97,5-100%]	219/220 99,5% [97,5-100%]
Especificidade	Combinado	550/558 98,6% [97,2-99,4%]	548/558 98,2% [96,7-99,1%]
Valor preditivo positivo	Expetoração em bruto	116/123 94,3% [88,6-97,7%]	115/124 92,7% [86,7-96,6%]
Valor preditivo positivo	Sedimento	23/24 95,8% [78,8-99,9%]	23/24 95,8% [78,8-99,9%]
Valor preditivo positivo	Combinado	139/147 94,5% [89,5-97,6%]	138/148 93,2% [87,9-96,7%]
Valor preditivo negativo	Expetoração em bruto	331/335 98,8% [97,0-99,7%]	329/334 98,5% [96,6-99,5%]
Valor preditivo negativo	Sedimento	219/219 100% [98,3-100%]	219/219 100% [98,3-100%]
Valor preditivo negativo	Combinado	550/554 99,3% [98,3-99,8%]	548/553 99,1% [97,9-99,7%]

Tabela 22 Sensibilidade e especificidade do **cobas®** MTB-RIF/INH utilizando amostras clínicas – resistência à INH

		Roche cobas® MTB-RIF/INH	Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance
Sensibilidade	Expetoração em bruto	150/154 97,4% [93,5-99,3%]	147/154 95,5% [90,9-98,2%]
Sensibilidade	Sedimento	35/37 94,6% [81,8-99,3%]	32/37 86,5% [71,2-95,5%]
Sensibilidade	Combinado	185/191 96,9% [93,3-98,8%]	179/191 93,7% [89,3-96,7%]
Especificidade	Expetoração em bruto	297/299 99,3% [97,6-99,9%]	297/299 99,3% [97,6-99,9%]
Especificidade	Sedimento	206/207 99,5% [97,3-100%]	206/207 99,5% [97,3-100%]
Especificidade	Combinado	503/506 99,4% [98,3-99,9%]	503/506 99,4% [98,3-99,9%]
Valor preditivo positivo	Expetoração em bruto	150/152 98,7% [95,3-99,8%]	147/149 98,7% [95,2-99,8%]
Valor preditivo positivo	Sedimento	35/36 97,2% [85,5-99,9%]	32/33 97,0% [84,2-99,9%]
Valor preditivo positivo	Combinado	185/188 98,4% [95,4-99,7%]	179/182 98,4% [95,3-99,7%]
Valor preditivo negativo	Expetoração em bruto	297/301 98,7% [96,6-99,7%]	297/304 97,7% [95,3-99,1%]
Valor preditivo negativo	Sedimento	206/208 99,0% [96,6-100%]	206/211 97,6% [94,6-99,2%]
Valor preditivo negativo	Combinado	503/509 98,8% [97,5-99,6%]	503/515 97,7% [96,0-98,9%]

Equivalência dos sistemas/comparação dos sistemas

Foi demonstrada a equivalência dos sistemas **cobas®** 5800, **cobas®** 6800 e **cobas®** 8800 através de estudos de desempenho. Os resultados apresentados nas Instruções de utilização, suportam um desempenho equivalente em todos os sistemas.

Informações adicionais

Características principais do ensaio

Tipos de amostras

- Expetoração em bruto
- 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 em bruto, 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 expetoração/LBA, o equipamento processa 0,85 ml

Símbolos

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

Tabela 23 Símbolos utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

 Idade ou data de nascimento	 Dispositivo não para testagem junto do paciente	 UI QS por reação PCR, utilize as Unidades Internacionais QS (UI) por reação PCR no cálculo dos resultados.
 Software auxiliar	 Dispositivo não para autotestes	 Número de série
 Intervalo atribuído (cópias/mL)	 Distribuidor (Nota: o país/região aplicável poderá estar indicado por baixo do símbolo.)	 Centro
 Intervalo atribuído (UI/mL)	 Não reutilizar	 Procedimento padrão
 Representante autorizado na Comunidade Europeia	 Mulher	 Esterilizado com óxido de etileno
 Folha de dados de códigos de barras	 Apenas para avaliação do desempenho IVD	 Armazenar no escuro
 Número do lote	 Global Trade Item Number	 Limite de temperatura
 Risco biológico	 Importador	 Ficheiro de definição de teste
 Referência de catálogo	 Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Este lado para cima
 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>	 Limite inferior do intervalo atribuído	 Procedimento ultrasensível
 Data da colheita	 Homem	 Identificador único do dispositivo
 Consulte as instruções de utilização	 Fabricante	 Limite superior do intervalo atribuído
 Conteúdo suficiente para <n> testes	 Controlo negativo	 Linha de enchimento da urina
 Conteúdo do kit	 Não esterilizado	 Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a um médico ou a pedido deste.
 Controlo	 Nome do paciente	 Prazo de validade
 Data de fabrico	 Número do paciente	
 Dispositivo para testagem junto do paciente	 Abra aqui	
 Dispositivo para autotestes	 Controlo positivo	
	 Cópias QS por reação PCR, utilize as cópias QS por reação PCR no cálculo dos resultados.	

Apoio técnico

Para apoio técnico (assistência) entre em contacto com a sua filial local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricante

Tabela 24 Fabricante

Fabricado nos Estados Unidos



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

Fabricado nos EUA

Marcas comerciais e patentes

Consulte <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Direitos de autor

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografia

1. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Sitthidet Tharinjaroen C, Intorasoot S, Anukool U, et al. Novel targeting of the *lepB* gene using PCR with confronting two-pair primers for simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium bovis*. *J Med Microbiol*. 2016;65:36-43.
3. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1296-9.
4. 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.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR Recomm Rep*. 2000;49:1-51.
6. 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;60:1650-3.
7. Orenstein EW, Basu S, Shah NS, et al. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:153-61.
8. Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *J Infect Dis*. 2015;211 Suppl 2:S21-8.
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 (N Y)*. 1992;10:413-7.
11. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
12. Chosewood LC, Wilson DE, eds. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. US Department of Health and Human Services; 2009.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections*. 4th ed. M29-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA; 2014.
14. World Health Organization. *Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual*. WHO: Geneva, Switzerland; 2012.
15. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. Centers for Disease Control: Atlanta, GA; 1985.

Revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev. 2.0 05/2024	Atualização das diretivas de biossegurança para adaptação a regulamentos locais, correções gramaticais e dados/referência da OMS. Rx Only removido da primeira página. Atualizada a página de símbolos harmonizados. Passagem de “com pelo menos 18 anos” de Limitações do procedimento para Desempenho utilizando amostras clínicas. Marca cobas® atualizada. Indicação de autoridade competente atualizada. Se tiver quaisquer questões, por favor contacte o representante local da Roche.

O resumo de relatório de segurança e de desempenho pode ser encontrado utilizando o seguinte link:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>