

Xpert® Carba-R

REF **GXCARBAR-CE-10**
GXCARBAR-CE-120

Trademark, Patents and Copyright Statements

Cepheid®, the Cepheid logo, GeneXpert® and Xpert® are trademarks of Cepheid.

Windows® is a trademark of Microsoft Corporation.

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

Copyright © Cepheid 2015. All rights reserved.



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA
Phone: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France
Phone: +33 563 825 300
Fax: +33 563 825 301

Xpert® Carba-R

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.

1 Nome sujeito a direito de propriedade

Xpert® Carba-R

2 Nome comum ou habitual

Ensaio Xpert Carba-R Assay

3 Utilização prevista

O Xpert Carba-R Assay da Cepheid executado nos sistemas do instrumento GeneXpert® consiste num teste diagnóstico *in vitro* qualitativo concebido para a detecção e diferenciação rápida das sequências dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP-1} associados à não susceptibilidade a carbapenemos em bactérias Gram-negativas obtidas a partir de amostras de zaragatoas rectais em doentes em risco de colonização intestinal com bactérias não susceptíveis a carbapenemos. O teste utiliza a reacção em cadeia de polimerase (PCR) automática em tempo real. O Xpert Carba-R Assay tem como objectivo auxiliar na detecção de bactérias não susceptíveis a carbapenemos que colonizam doentes em unidades de cuidados de saúde. O Xpert Carba-R Assay não se destina a orientar ou monitorizar o tratamento de infecções bacterianas não susceptíveis a carbapenemos. São necessárias culturas concomitantes para recuperar organismos para tipagem epidemiológica, teste de susceptibilidade antimicrobiana e para posterior identificação confirmatória de bactérias não susceptíveis a carbapenemos.

4 Resumo e explicação

O alastramento global de espécies de Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* (ou seja, organismos não susceptíveis a carbapenemos, CNSO) é um problema médico e de saúde pública grave.^{1,2} Estas bactérias são normalmente resistentes a todos os agentes beta-lactâmicos e frequentemente co-resistentes a diversas classes de outros agentes antimicrobianos, verificando-se uma grande limitação nas opções de tratamento.³ A determinação do alastramento de CNSO é uma tarefa complexa devido à diversidade de enzimas hidrolisantes de carbapenemos que têm surgido e à capacidade dos genes para se disseminarem entre as diversas espécies bacterianas. Alguns dos genes de resistência, como os determinantes de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), estão associados a linhagens clonais bem sucedidas de bactérias (por ex., *K. pneumoniae* ST258),⁴ que têm uma vantagem selectiva em unidades hospitalares onde a utilização antimicrobiana é elevada. As oportunidades para a transmissão de organismos são normalmente frequentes, com maior disseminação dos genes de resistência através de plasmídeos transmissíveis e integrões. A estirpe ST258 da *K. pneumoniae* provocou várias epidemias a nível global, principalmente nos Estados Unidos da América¹ e em Israel.⁵ Do mesmo modo, os organismos que contêm o gene codificado New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM) foram introduzidos na Europa por indivíduos que, na maioria dos casos, visitaram a Índia ou o Paquistão.⁶ Um terceiro mecanismo de resistência a carbapenemos, a via mediada por VIM (Verona integron-mediated metallo-beta-lactamase) tem sido uma fonte de preocupação na Europa desde há vários anos. Metallo-beta-lactamases adicionais, como as da classe imipenemase (IMP), foram reconhecidas no Japão e noutros países asiáticos há vários anos e estão agora a alastrar-se a nível global,³ ao passo que a oxacillina, OXA-48 de classe D, que frequentemente medeia a resistência de baixo nível a carbapenemos, mas não a resistência ao espectro alargado de beta-lactamases, está agora a alastrar rapidamente na Europa.^{7,8} Actualmente, o método padrão para a detecção de doentes colonizados com organismos não susceptíveis a carbapenemos consiste na colheita de amostras de zaragatoas rectais ou peri-rectais em placas de ágar não selectivas, como ágar MacConkey, seguidas de testes à susceptibilidade antimicrobiana de colónias com fermentação em lactose ou utilizando meios em ágar de rastreio selectivos.⁹ A primeira é trabalhosa e podem ser necessários vários dias até ser gerado um resultado final, ao passo que a última abordagem varia consideravelmente em termos de sensibilidade e especificidade com base no meio selectivo utilizado. Um método rápido e rigoroso para o rastreio de doentes relativamente à colonização com CNSO irá facilitar a capacidade dos programas de controlo de infecções no que diz respeito à interrupção do alastramento de CNSO em hospitais e outras unidades de cuidados de saúde. Nos Estados Unidos da América, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) recomenda que seja efectuado o rastreio de doentes relativamente à colonização com CNSO sempre que seja reconhecida uma estirpe de Enterobacteriaceae resistente a carbapenemos num hospital.¹⁰ Diversos países europeus, incluindo o Reino Unido, a França e os Países Baixos, dispõem também de políticas a nível nacional que defendem o rastreio de doentes relativamente a CNSO na fase de admissão hospitalar, principalmente se tiverem sido anteriormente hospitalizados no estrangeiro.⁹

5 Princípio do procedimento

O sistema de instrumentos GeneXpert (GX) automatiza e integra a preparação de amostras, a extracção e amplificação de ácidos nucleicos e a detecção da sequência-alvo em amostras simples ou complexas, utilizando ensaios de PCR em tempo real. Os sistemas são constituídos por um instrumento, um computador e software pré-carregado para a execução de testes e visualização dos resultados. Os sistemas requerem a utilização de cartuchos descartáveis, de utilização única, que contêm os reagentes de PCR e onde decorre esse processo. Dado que os cartuchos são independentes, é minimizada a contaminação cruzada entre amostras. Para uma descrição completa do sistema, consulte o *GeneXpert Dx System Operator Manual* (Manual do operador do GeneXpert Dx System) ou o *GeneXpert Infinity System Operator Manual* (Manual do operador do GeneXpert Infinity System).

O ensaio Xpert Carba-R Assay inclui reagentes para a detecção de sequências de genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, e *bla_{IMP-1}*, bem como um controlo de processamento da amostra (SPC) para controlo do processamento adequado da bactéria alvo e para indicar a presença de inibidor(es) na reacção PCR. O SPC também assegura que as condições da reacção PCR (temperatura e tempo) são apropriadas para a reacção de amplificação e que os reagentes da PCR estão funcionais. Um controlo interno, o controlo de verificação da sonda (PCC) verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo de PCR no cartucho, a integridade da sonda e a estabilidade do corante.

Os iniciadores e sondas no ensaio Xpert Carba-R Assay detectam sequências exclusivas para as sequências de genes *bla_{KPC}* (KPC), *bla_{NDM}* (NDM), *bla_{VIM}* (VIM), *bla_{OXA-48}* (OXA-48), and *bla_{IMP-1}* (IMP-1) associadas à não susceptibilidade a carbapenemos em bactérias Gram-negativas.

6 Reagentes e instrumentos

6.1 Materiais fornecidos



O kit do ensaio Xpert Carba-R Assay contém reagentes suficientes para processar 10 amostras. O kit do ensaio Xpert Carba-R Assay contém reagentes suficientes para processar 120 amostras. Os kits contêm o seguinte:

Cartuchos do ensaio Xpert Carba-R Assay com tubos de reacção integrados

	10 por kit	120 por kit
• Esfera 1, Esfera 2 e Esfera 3 (secagem por congelamento)	1 de cada por cartucho	1 de cada por cartucho
• Reagente 1	3 ml por cartucho	3 ml por cartucho
• Reagente 2 (cloreto de guanidina)	2,5 ml por cartucho	2,5 ml por cartucho

Frascos de reagente de amostra do Xpert Carba-R Assay

	10 por kit	120 por kit
• Reagente de amostra	5,0 ml por cartucho	5,0 ml por cartucho

Pipetas de transferência descartáveis (1,7 ml)

	10 por kit	120 por kit
CD	1 por kit	1 por kit

- Ficheiros de definição do ensaio (ADF — assay definition files)
- Instruções para importar o ADF para o software
- Folheto informativo

Nota As Fichas de Dados de Segurança (FDS) estão disponíveis em www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com, no separador SUPPORT (APOIO).

Nota A soroalbumina bovina (BSA) presente nas esferas deste produto foi produzida a partir de plasma bovino proveniente exclusivamente dos EUA. Os animais não foram alimentados com nenhuma proteína de ruminante ou outra proteína animal e foram aprovados nos testes ante- e post-mortem. Durante o processamento, não houve mistura do material com outros materiais animais.

6.2 Conservação e manuseamento



- Conserve os cartuchos e os reagentes do ensaio Xpert Carba-R Assay entre 2 °C e 28 °C.

- Não abra um cartucho até estar pronto para realizar o teste.



- Não utilize reagentes ou cartuchos que tenham ultrapassado o prazo de validade.
- O reagente de amostra é um líquido transparente e incolor. Não utilize o reagente de amostra se este ficar turvo ou descolorido.
- Utilize o cartucho no período de 30 minutos depois de abrir a tampa.
- Não utilize um cartucho com fuga.

6.3 Materiais necessários mas não fornecidos

- Sistema GeneXpert Dx ou sistemas GeneXpert Infinity (a referência varia consoante a configuração): instrumento GeneXpert de seis cores, computador com software patentado GeneXpert versão 4.3 ou superior, leitor de código de barras e manual do utilizador
- Dispositivo de colheita de amostras: Referência Cepheid 900-0370
- Impressora: Caso necessite de uma impressora, contacte a assistência técnica da Cepheid para tratar da aquisição de uma impressora recomendada.
- Agitador de vórtice

7 Advertências e precauções



- Trate todas as amostras biológicas, incluindo os cartuchos usados, como sendo capazes de transmitir agentes infecciosos. Dado que é frequentemente impossível saber quais as amostras biológicas que poderão ser infecciosas, todas devem ser tratadas aplicando as precauções padrão. Orientações para o manuseamento de amostras estão disponíveis nos Centers for Disease Control and Prevention¹¹ e Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards) dos EUA.¹²
- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição quando trabalhar com químicos e manusear amostras biológicas.
- Consulte os técnicos responsáveis pelos resíduos ambientais da sua instituição relativamente à eliminação correcta de cartuchos usados e reagentes não usados. Verificar as regulamentações estaduais e locais, uma vez que estas poderão diferir das regulamentações federais de eliminação de resíduos. Este material pode apresentar características de resíduos perigosos, pelo que serão necessários requisitos de eliminação específicos. As instituições devem verificar os requisitos de eliminação de resíduos perigosos dos respectivos países.
- Recomenda-se o seguimento das boas práticas de laboratório e a troca de luvas entre o manuseamento de amostras de doentes diferentes para evitar a contaminação de amostras ou de reagentes.
- Não substitua o reagente de amostra do Xpert Carba-R Assay por outros reagentes.
- Não abra a tampa do cartucho do Xpert Carba-R Assay até estar pronto para adicionar a amostra purificada da zaragatoa.
- Não utilize um cartucho que tiver caído depois de o ter retirado da embalagem.
- Não agite o cartucho. Agitar ou deixar cair o cartucho após a abertura da respectiva tampa pode produzir resultados inválidos.
- Não coloque o rótulo de ID da amostra na tampa do cartucho ou no rótulo do código de barras.



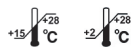
- Cada cartucho de utilização única do Xpert Carba-R Assay é utilizado para processar um teste. Não reutilize cartuchos gastos.
- Não utilizar um cartucho que tenha um tubo de reacção danificado.
- Use batas limpas e luvas. Troque de luvas entre o processamento de cada amostra.
- Na eventualidade da contaminação da área de trabalho ou do equipamento com amostras ou controlos, limpe bem a área contaminada com lixívia doméstica diluída de 1:10 e depois com uma solução de etanol a 70% ou de isopropanol a 70%. Limpe as superfícies de trabalho até secarem completamente antes de prosseguir.



- O reagente 2 contém cloreto de guanidina (H302, nocivo em caso de ingestão; H315, irritante cutâneo; e H319, causa grave irritação ocular).

8 Colheita, transporte e conservação de amostras

1. Proceda à colheita de uma zaragatoa rectal emparelhada inserindo cuidadosamente ambas as pontas da zaragatoa aproximadamente 1 cm para além do esfíncter anal e rode suavemente.
2. Coloque o par de zaragatoas novamente no tubo de transporte original.
3. As zaragatoas do tubo de transporte podem ser conservadas entre 15 °C e 28 °C até seis horas e, posteriormente, entre 2 °C e 28 °C durante sete dias.
4. As zaragatoas rectais colocadas no reagente de amostra no dia da colheita podem ser conservadas entre 2 °C e 28 °C até quatro dias.



9 Procedimento

9.1 Preparação do cartucho

Importante Coloque o cartucho no instrumento GeneXpert no período de 30 minutos após a adição da amostra no cartucho.

Para adicionar a amostra da zaragatoa ao cartucho:

1. Retire o cartucho e o frasco do reagente de amostra do kit.
2. Abra um frasco do reagente de amostra fornecido e coloque uma zaragatoa no frasco.
3. Coloque novamente a zaragatoa não utilizada no tubo de transporte e conserve entre 2 °C e 28 °C. Consulte a Secção 8.



Nota Envolve a haste da zaragatoa e a abertura do tubo com gaze esterilizada para minimizar o risco de contaminação.

4. Segure na zaragatoa pela haste perto do bordo do frasco, levante a zaragatoa para cima alguns milímetros do fundo do frasco e dobre a haste sobre a extremidade do frasco de modo a quebrá-la na marca do entalhe, deixando a zaragatoa suficientemente curta para permitir que caiba no frasco e a tampa fique bem fechada.
5. Feche a tampa do reagente de amostra e agite no agitador de vórtice à velocidade máxima durante 10 segundos.
6. Abra a tampa do cartucho. Utilizando a pipeta de transferência fornecida, aspire o reagente de amostra até à marcação na pipeta (aproximadamente de 1,7 ml, consulte a Figura 1) e, de seguida, transfira o material para a câmara da amostra do cartucho Xpert Carba-R. Ver Figura 2. A amostra que resta no frasco de reagente de amostra pode ser conservada entre 2 °C e 28 °C até quatro dias a contar do dia de colheita caso seja necessário repetir o teste.

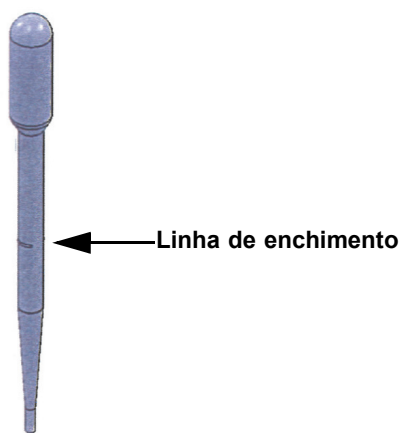


Figura 1. Pipeta de transferência para transferir amostra para o cartucho

7. Feche a tampa do cartucho e coloque o cartucho no instrumento GeneXpert no prazo de 30 minutos.

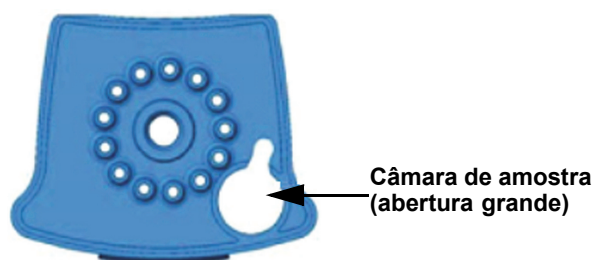


Figura 2. Cartucho do Xpert Carba-R Assay (vista superior)

9.2 Iniciar o teste

Importante

Antes de iniciar o teste, certifique-se de que o ficheiro de definição do Xpert Carba-R Assay foi importado para o software. Esta secção discrimina os passos básicos para realizar o teste. Para obter instruções detalhadas, consulte o *GeneXpert Dx System Operator Manual* (Manual do operador do GeneXpert Dx System) ou o *GeneXpert Infinity System Operator Manual* (Manual do operador do GeneXpert Infinity System).

Nota

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

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

Nota

Se o código de barras no cartucho do Xpert Carba-R não for lido, configure um novo teste, seguindo o procedimento de repetição do teste na Secção 13.

7. Clique em **Iniciar teste** (GeneXpert Dx) ou **Submit (Enviar)** (Infinity). Introduza a sua palavra-passe se lhe for solicitada.
8. Para o GeneXpert Infinity System: coloque o cartucho no tapete rolante. O cartucho será automaticamente carregado, o teste será executado e o cartucho usado será colocado no recipiente para resíduos.

ou

Para o instrumento GeneXpert Dx:

- A. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e carregue o cartucho.
- B. Feche a porta. O teste inicia-se e a luz verde pára de piscar. Quando o teste termina, a luz desliga-se.
- C. Espere até que o sistema destranque o fecho da porta antes de abrir a porta do módulo. De seguida, remova o cartucho.
- D. Os cartuchos usados devem ser eliminados nos recipientes apropriados para resíduos de amostras, de acordo com as práticas padrão da sua instituição.

9.3 Visualização e impressão de resultados

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

1. Clique no ícone **Ver resultados** para visualizar os resultados.
2. Após a conclusão do teste, clique no botão **Relatório** da janela Ver resultados para visualizar e/ou gerar um relatório em ficheiro PDF.

10 Controlo da qualidade

CONTROL

Controlos de qualidade integrados

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

- **Controlo de processamento da amostra (SPC)** — Assegura que a amostra foi processada correctamente. O SPC contém esporos de *Bacillus globigii*, sob a forma de uma esfera seca que está incluída em cada cartucho para verificar o processamento adequado da amostra. O SPC verifica se ocorreu a lise da bactéria caso os organismos estiverem presentes e verifica se o processamento da amostra é adequado. Adicionalmente, este controlo detecta a inibição do ensaio de PCR em tempo real associada à amostra, assegura que as condições da reacção de PCR (temperatura e tempo) são adequadas para a reacção de amplificação e que os reagentes de PCR estão funcionais. O SPC deve ser positivo em amostras negativas e pode ser negativo ou positivo em amostras positivas. O SPC é aprovado se preencher os critérios de aceitação validados.
- **Controlo de verificação da sonda (PCC)** — Antes do início da reacção PCR, o sistema GeneXpert mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a reidratação da esfera, o enchimento do tubo de reacção, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. A verificação da sonda passa se corresponder aos critérios de aceitação atribuídos.

Controlos externos

Podem ser utilizados controlos externos de acordo com organizações de acreditação locais, nacionais e europeias, consoante aplicável.

11 Interpretação dos resultados

Os resultados são interpretados pelo GeneXpert System através da medição de sinais fluorescentes e algoritmos de cálculo integrados, sendo mostrados na janela Ver resultados. Não são apresentadas capturas de ecrã nem interpretações para todas as combinações de resultados possíveis com os cinco analitos alvo no Xpert Carba-R Assay; contudo, os exemplos que se seguem são indicativos do tipo de resultados que podem ser esperados.

Nota

A tabela e as figuras seguintes ilustram apenas exemplos representativos dos tipos de resultados que podem esperar-se com o ensaio Xpert Carba-R Assay. Não são apresentadas todas as combinações de resultados possíveis com os cinco analitos alvo.

Tabela 1. Resultados representativos e interpretação do Xpert Carba-R Assay

Resultado	Interpretação
IMP1 DETECTADO; VIM NÃO DETECTADO; NDM NÃO DETECTADO; KPC NÃO DETECTADO; OXA48 NÃO DETECTADO Ver Figura 3.	A sequência do ADN-alvo IMP-1 é detectada; As sequências do ADN-alvo VIM, NDM, KPC e OXA-48 não são detectadas. • A amplificação por PCR do ADN-alvo IMP-1 apresenta um valor de Ct dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) de fluorescência superior à definição do valor limite; As sequências do ADN-alvo VIM, NDM, KPC e OXA-48 estão ausentes ou são inferiores ao nível de detecção do ensaio. • SPC: Não aplicável. O SPC é ignorado porque a amplificação do ADN-alvo de IMP-1 pode interferir com este controlo. • PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.

Tabela 1. Resultados representativos e interpretação do Xpert Carba-R Assay (Continuação)

Resultado	Interpretação
IMP1 NÃO DETECTADO; VIM DETECTADO; NDM NÃO DETECTADO; KPC NÃO DETECTADO; OXA48 NÃO DETECTADO Ver Figura 4.	A sequência do ADN-alvo VIM é detectada; As sequências do ADN-alvo IMP-1, NDM, KPC e OXA-48 não são detectadas. - A amplificação por PCR do ADN-alvo VIM apresenta um valor de Ct dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) de fluorescência superior à definição do valor limite; As sequências do ADN-alvo IMP-1, NDM, KPC e OXA-48 estão ausentes ou são inferiores ao nível de detecção do ensaio. - SPC: Não aplicável. O SPC é ignorado porque a amplificação do ADN-alvo de VIM pode interferir com este controlo. - PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
IMP1 NÃO DETECTADO; VIM DETECTADO; NDM DETECTADO; KPC NÃO DETECTADO; OXA48 NÃO DETECTADO Ver Figura 5.	As sequências do ADN-alvo VIM e NDM são detectadas; As sequências do ADN-alvo IMP-1, KPC e OXA-48 não são detectadas. - A amplificação por PCR dos ADN-alvo VIM e NDM apresenta um valor de Ct dentro dos intervalos válidos e endpoints (pontos finais) de fluorescência acima das definições do valor limite; As sequências do ADN-alvo IMP-1, KPC e OXA-48 estão ausentes ou são inferiores ao nível de detecção do ensaio. - SPC: Não aplicável. O SPC é ignorado porque as amplificações do ADN-alvo VIM e NDM podem interferir com este controlo. - PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
IMP1 DETECTADO; VIM NÃO DETECTADO; NDM DETECTADO; KPC NÃO DETECTADO; OXA48 NÃO DETECTADO Ver Figura 6.	As sequências do ADN-alvo IMP-1 e NDM são detectadas; As sequências do ADN-alvo VIM, KPC e OXA-48 não são detectadas. - A amplificação por PCR do ADN-alvo IMP-1 e NDM apresenta valores de Ct dentro dos intervalos válidos e endpoints (pontos finais) de fluorescência superiores às definições de valor limite; As sequências do ADN-alvo VIM, KPC e OXA-48 estão ausentes ou são inferiores ao nível de detecção do ensaio. - SPC: Não aplicável. O SPC é ignorado porque as amplificações do ADN-alvo IMP-1 e NDM podem interferir com este controlo. - PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
IMP1 DETECTADO; VIM DETECTADO; NDM NÃO DETECTADO; KPC NÃO DETECTADO; OXA48 DETECTADO Ver Figura 7.	As sequências do ADN-alvo IMP-1, VIM e OXA-48 são detectadas; As sequências do ADN-alvo NDM e KPC não são detectadas. - A amplificação por PCR do ADN-alvo IMP-1, VIM e OXA-48 apresenta valores de Ct dentro dos intervalos válidos e endpoints (pontos finais) de fluorescência superiores às definições de valor limite; As sequências de ADN-alvo KPC e NDM estão ausentes ou são inferiores ao nível de detecção do ensaio. - SPC: Não aplicável. O SPC é ignorado porque as amplificações do ADN-alvo IMP-1, VIM e OXA-48 podem interferir com este controlo. - PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
IMP1 DETECTADO; VIM DETECTADO; NDM DETECTADO; KPC NÃO DETECTADO; OXA48 DETECTADO Ver Figura 8.	As sequências do ADN-alvo IMP-1, VIM, NDM e OXA-48 são detectadas; A sequência de ADN-alvo KPC não foi detectada. - A amplificação por PCR do ADN-alvo IMP-1, VIM, NDM e OXA-48 apresenta valores de Ct dentro dos intervalos válidos e endpoints (pontos finais) de fluorescência superiores às definições de valor limite; a sequência de ADN-alvo KPC está ausente ou abaixo do nível de detecção do ensaio. - SPC: Não aplicável. O SPC é ignorado porque as amplificações do ADN-alvo IMP-1, VIM, NDM e OXA-48 podem interferir com este controlo. - PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.

Tabela 1. Resultados representativos e interpretação do Xpert Carba-R Assay (Continuação)

Resultado	Interpretação
IMP1 DETECTADO; VIM DETECTADO; NDM DETECTADO; KPC DETECTADO; OXA48 DETECTADO Ver Figura 9.	As sequências do ADN-alvo IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 são detectadas. - A amplificação por PCR do ADN-alvo IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 apresenta valores de Ct dentro dos intervalos válidos e endpoints (pontos finais) de fluorescência superiores às definições de valor limite. - SPC: Não aplicável. O SPC é ignorado porque as amplificações do ADN-alvo IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 podem interferir com este controlo. - PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
IMP1 NÃO DETECTADO; VIM NÃO DETECTADO; NDM NÃO DETECTADO; KPC NÃO DETECTADO; OXA48 NÃO DETECTADO Ver Figura 10.	As sequências do ADN-alvo IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 não são detectadas. - As sequências do ADN-alvo IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 estão ausentes ou são inferiores ao nível de detecção do ensaio. - SPC: APROVADO; A amplificação por PCR da sequência do ADN do SPC apresenta um valor de Ct dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) de fluorescência superior à definição do valor limite. - PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
INVÁLIDO Ver Figura 11.	A presença ou ausência de sequências do ADN-alvo de IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 não pode ser determinada. Utilize as instruções na Secção 13, Procedimento de repetição do teste, para repetir o teste. - SPC: FALHOU; Sem amplificação PCR da sequência do ADN do SPC ou o Ct do SPC não está dentro do intervalo válido e o endpoint (ponto final) de fluorescência é inferior à definição do valor limite. - PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
ERRO	A presença ou ausência de sequências do ADN-alvo de IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 não pode ser determinada. Utilize as instruções na Secção 13, Procedimento de repetição do teste, para repetir o teste. - SPC: SEM RESULTADO - PCC: FALHOU*; um ou mais dos resultados de verificação da sonda falharam. O PCC falhou provavelmente porque o tubo de reacção não foi adequadamente enchido ou porque foi detectado um problema de integridade da sonda. * Se a verificação da sonda foi aprovada, o erro é causado pela falha de um dos componentes do sistema.
SEM RESULTADO	A presença ou ausência de sequências do ADN-alvo de IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 não pode ser determinada. Utilize as instruções na Secção 13, Procedimento de repetição do teste, para repetir o teste. Não foram recolhidos dados suficientes para produzir um resultado de teste (por exemplo, o utilizador parou um teste que estava em curso ou ocorreu uma falha de alimentação). - SPC: SEM RESULTADO - PCC: Não aplicável

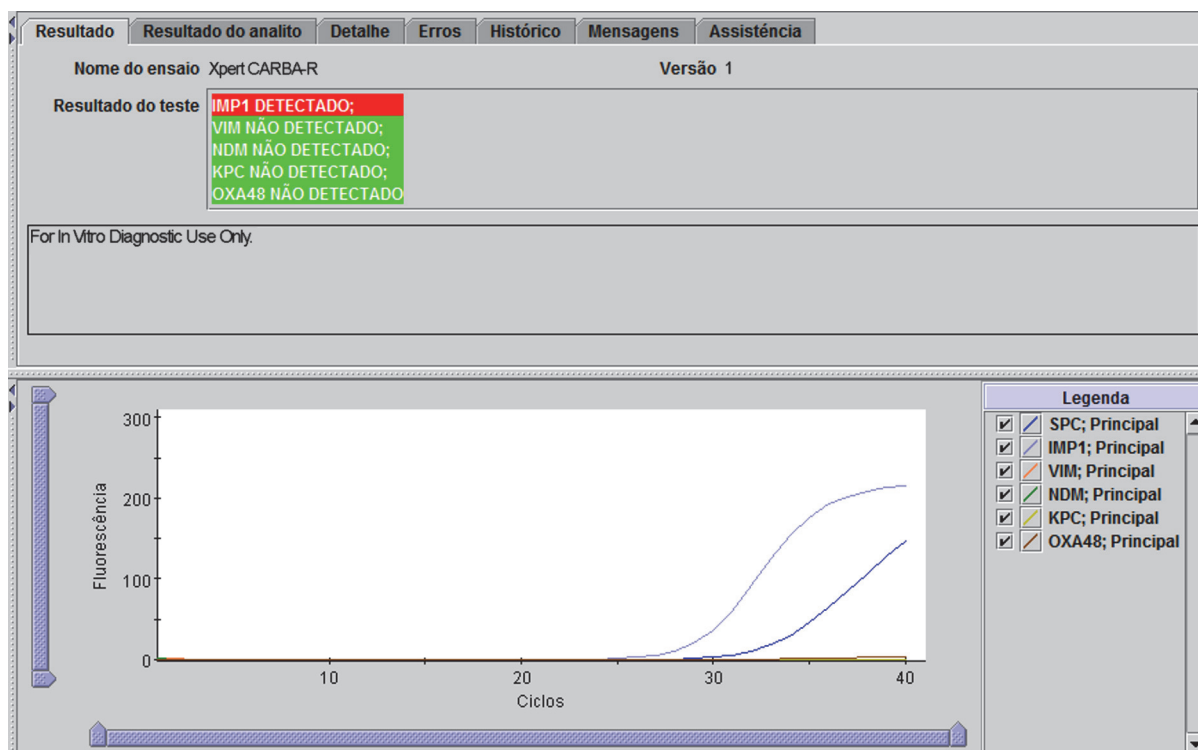


Figura 3. Carba-R Assay—IMP-1 Detectado

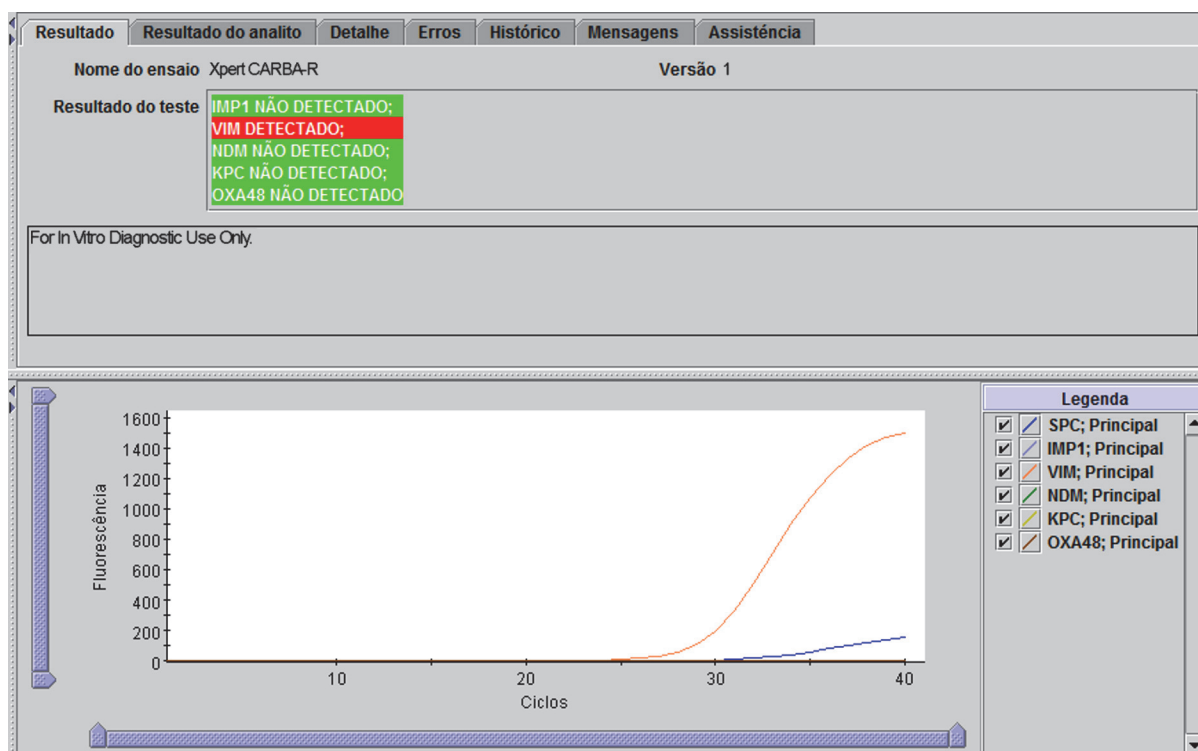


Figura 4. Carba-R Assay—VIM Detectado

Nota Não são apresentados exemplos de NDM positivo, KPC positivo e OXA positivo.

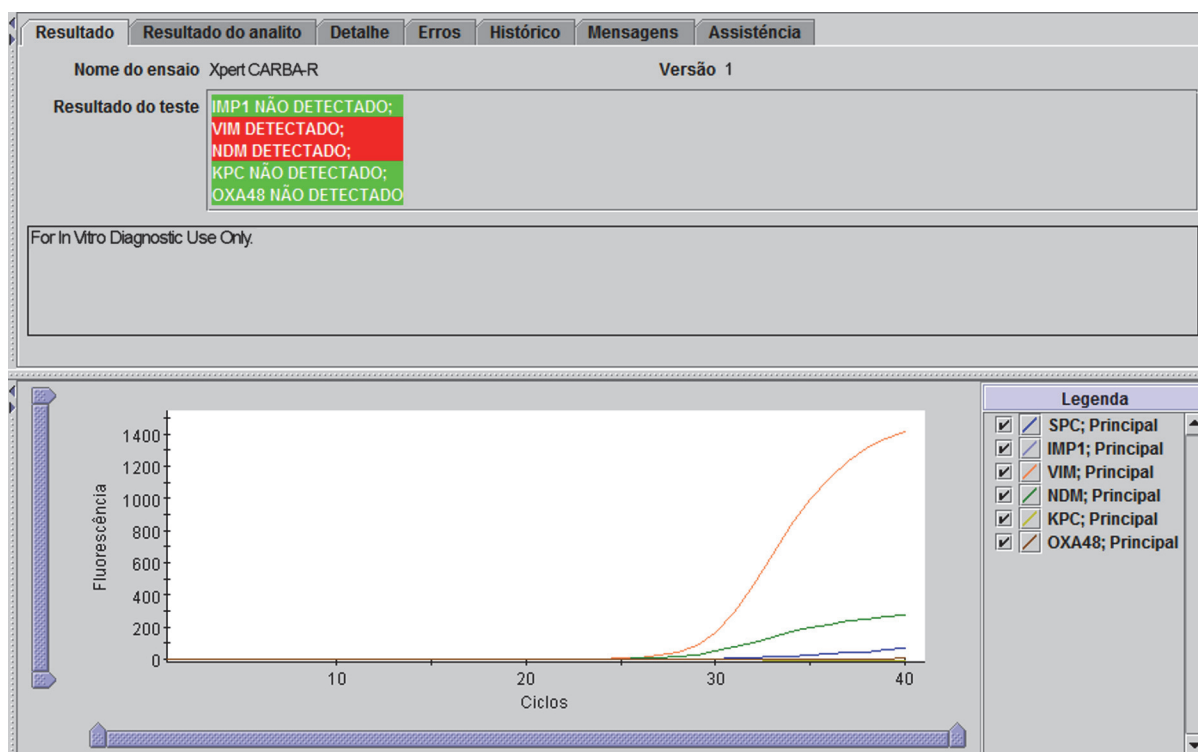


Figura 5. Carba-R Assay—VIM e NDM Detectado

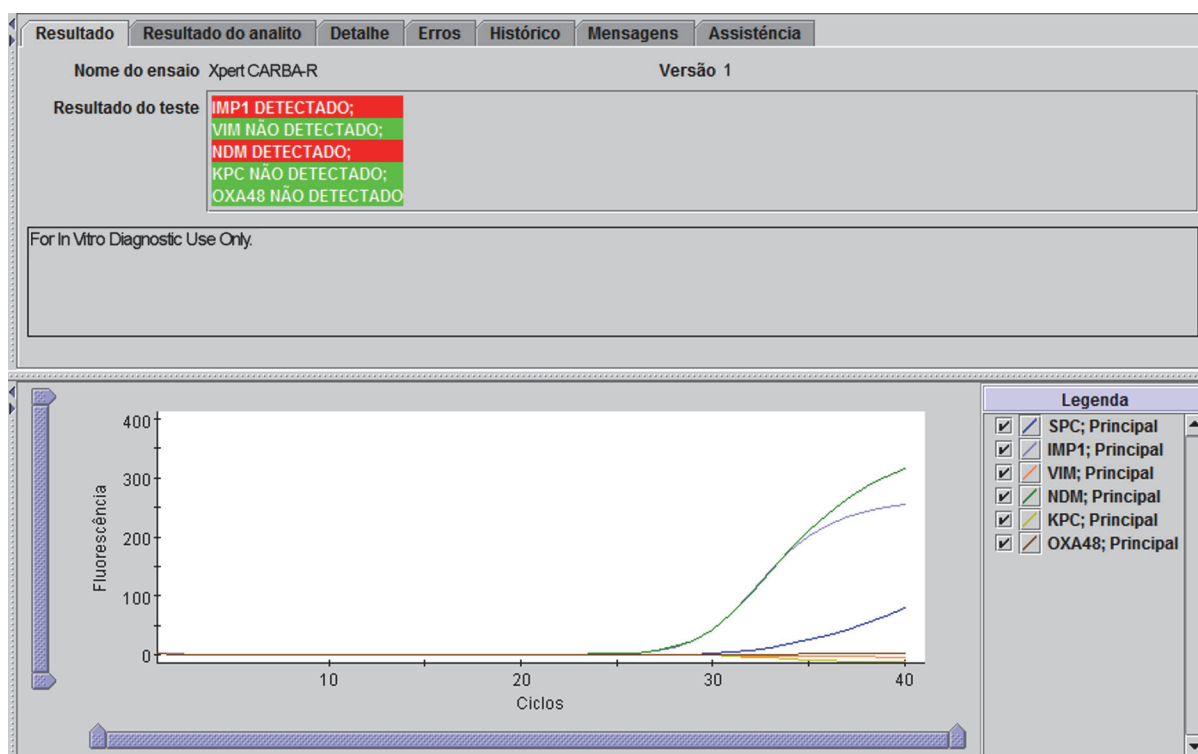


Figura 6. Carba-R Assay—IMP-1 e NDM Detectado

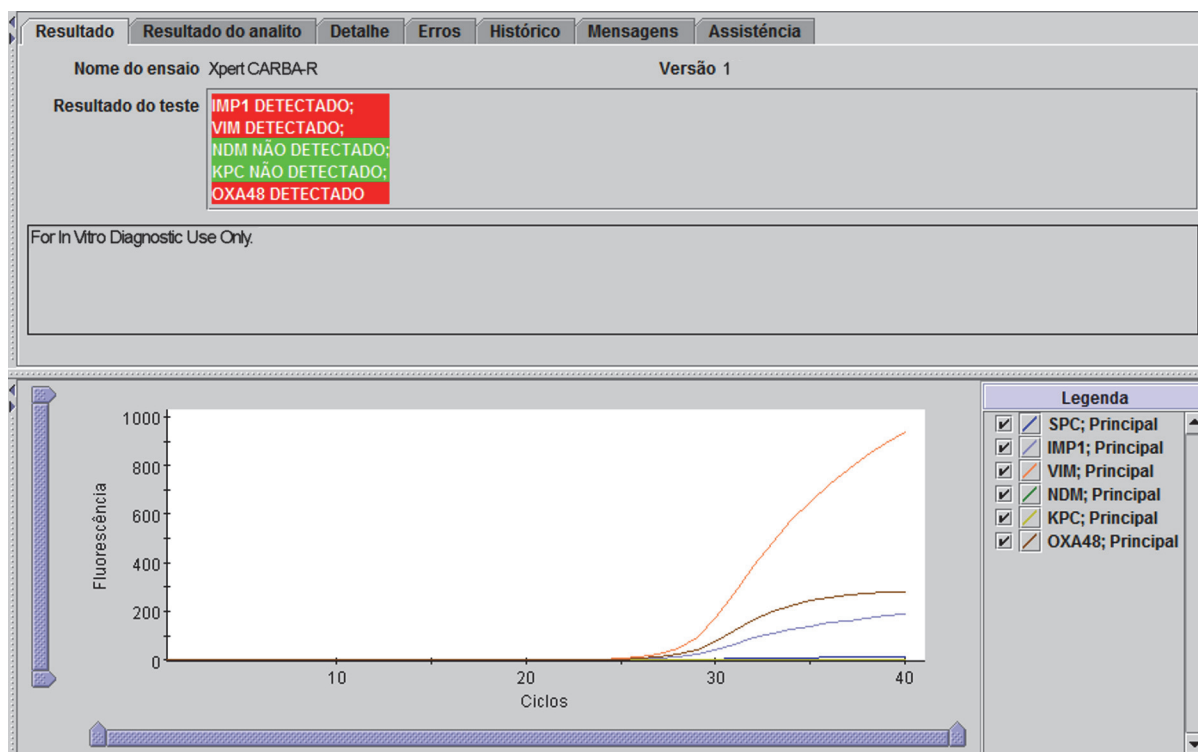


Figura 7. Carba-R Assay—IMP-1, VIM e OXA-48 Detectado

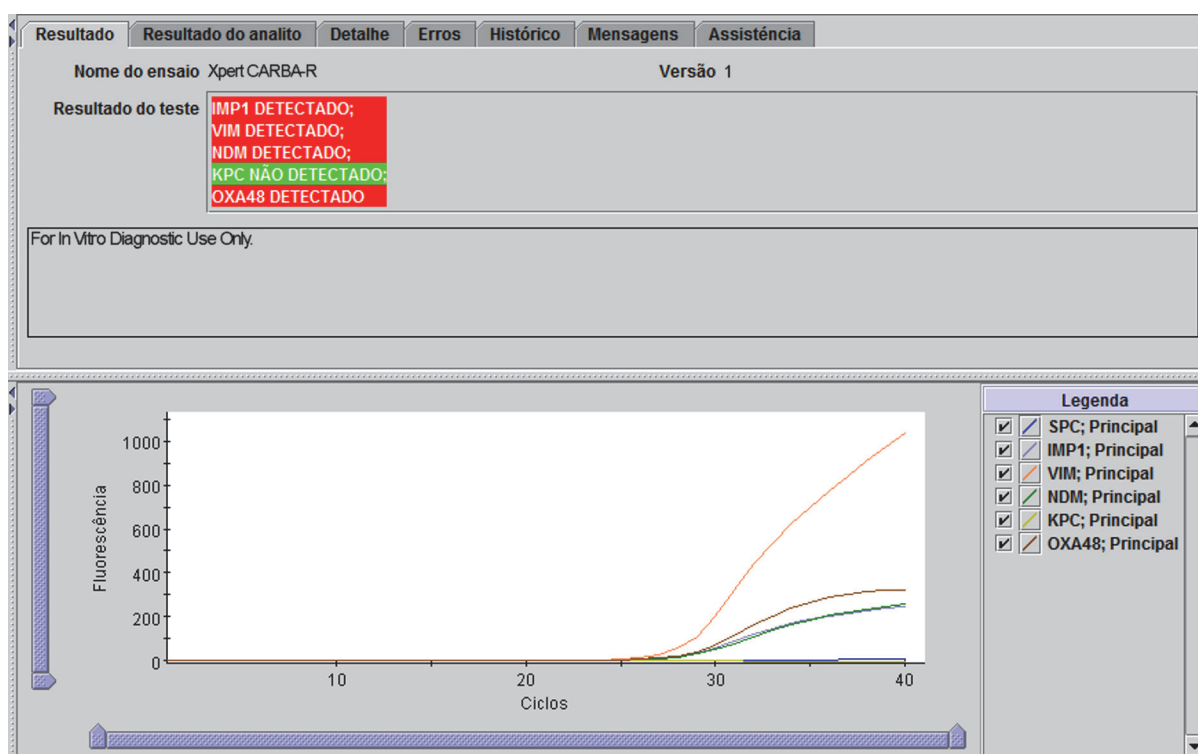


Figura 8. Carba-R Assay—IMP-1, VIM, NDM e OXA-48 Detectado

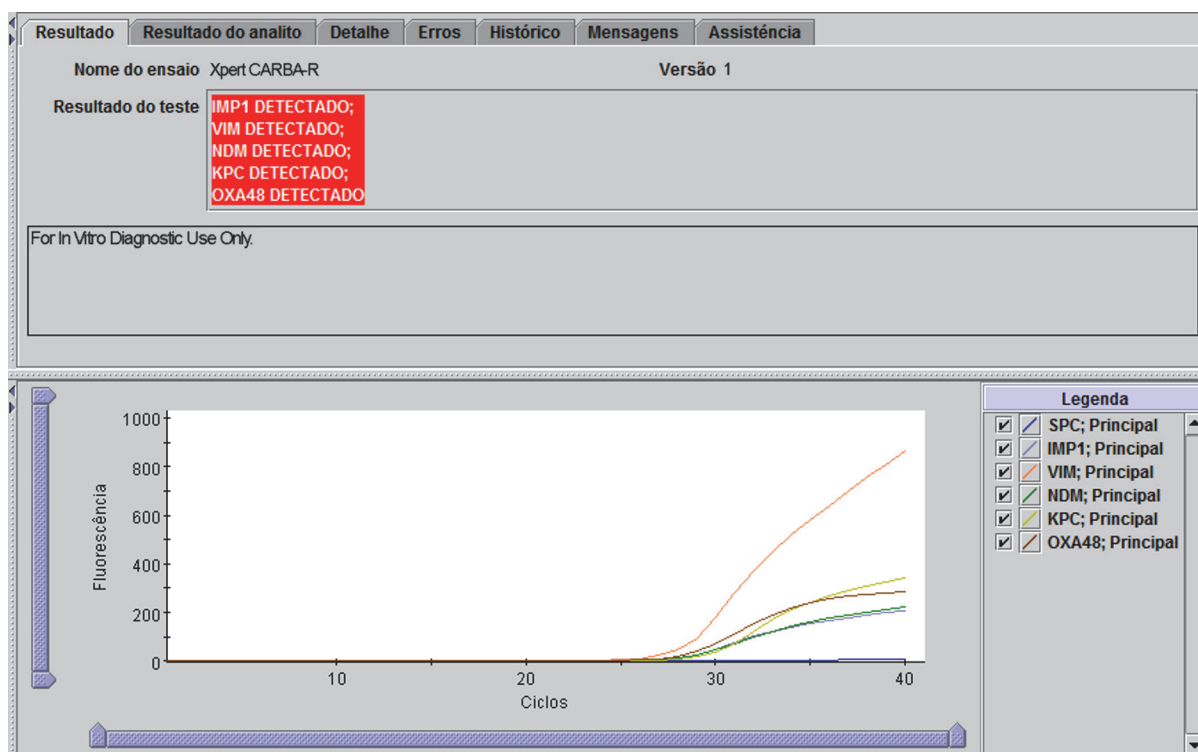


Figura 9. Carba-R Assay—IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 Detectado

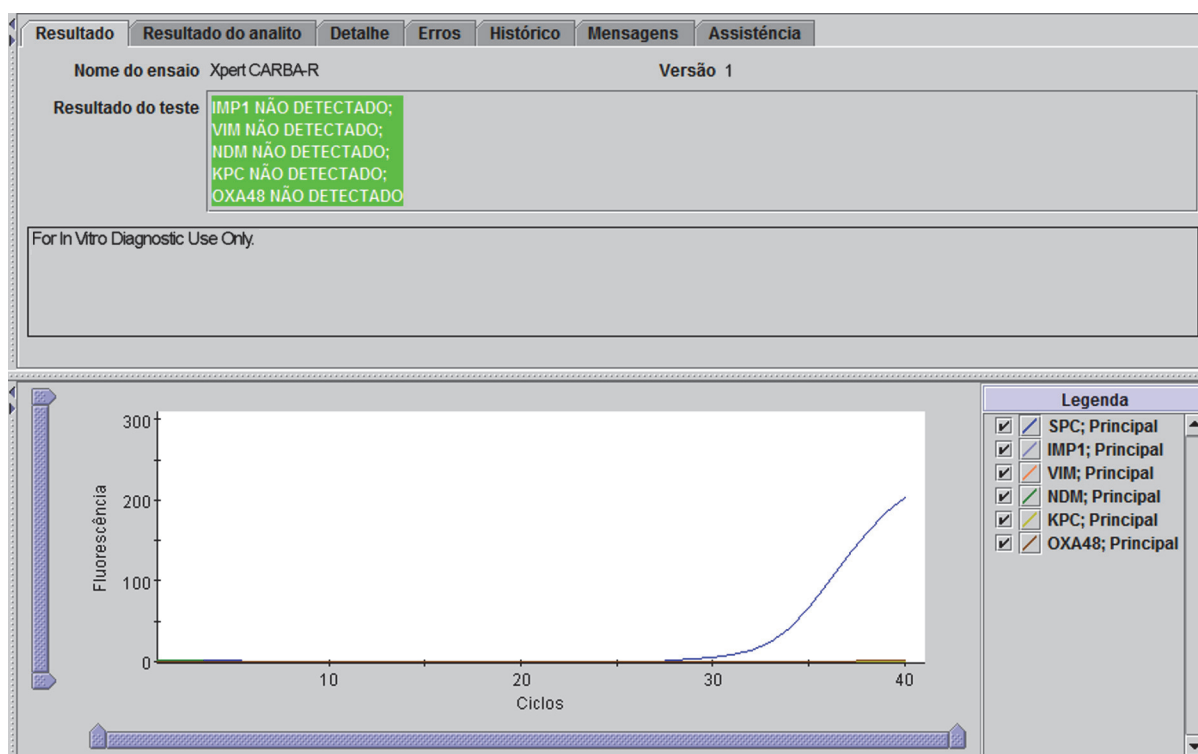


Figura 10. Carba-R Assay—IMP-1, VIM, NDM, KPC e OXA-48 Não detectado

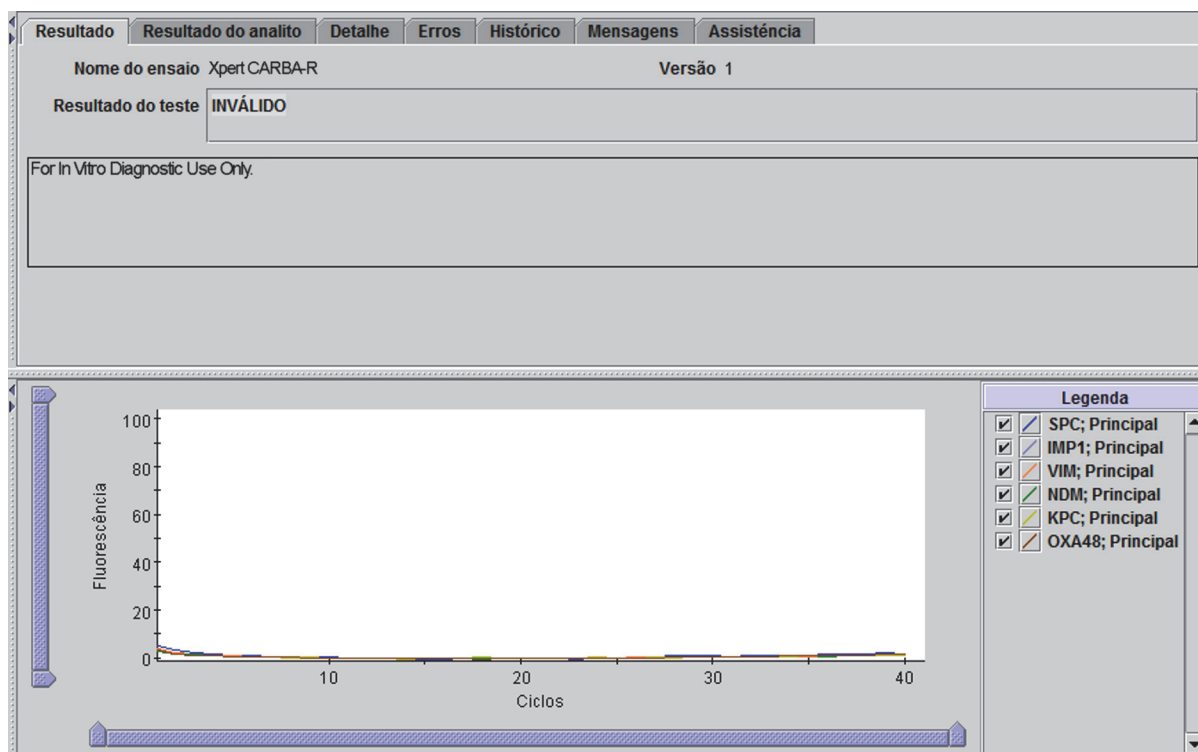


Figura 11. Carba-R Assay—Inválido

12 Motivos para repetir o teste

Repita o teste utilizando um novo cartucho (não reutilize o cartucho) e um novo frasco de reagente de amostra para diluição.

- Um resultado **INVÁLIDO** indica que o controlo SPC falhou. A amostra não foi adequadamente processada ou a PCR foi inibida ou o volume da amostra adicionada era inadequado.
- Um resultado **ERRO** indica que o controlo de verificação da sonda falhou e que o ensaio foi abortado, possivelmente devido ao tubo de reacção não ter sido adequadamente enchido, à detecção de um problema de integridade da sonda de reagente, a terem sido excedidos os limites de pressão máxima, ou ter sido detectado um erro de posicionamento da válvula.
- **SEM RESULTADO** indica que os dados colhidos foram insuficientes. Por exemplo, o operador parou um teste que estava em curso ou a alimentação eléctrica falhou.
- Se o desempenho do CQ externo não for o esperado, repita o teste de controlo externo e/ou contacte a Cepheid para assistência.

13 Procedimento de repetição do teste

1. Retire um novo cartucho e um novo frasco de reagente de amostra do kit.
2. Transfira o líquido restante do frasco de reagente de amostra original que contém a amostra de zaragatoa rectal agitado no agitador de vórtice (conservada entre 2 °C e 28 °C; ver Secção 9.1) para o novo frasco de reagente de amostra.
3. Feche a tampa do frasco do reagente de amostra e agite no agitador de vórtice à velocidade máxima durante 10 segundos.
4. Prosiga com os passos de teste subsequentes, começando no Passo 6 da Secção 9.1, Preparação do cartucho.

14 Limitações

- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Recomenda-se o seguimento das boas práticas de laboratório e a troca de luvas entre o manuseamento de amostras de doentes diferentes para evitar a contaminação de amostras ou de reagentes.
- Resultados de teste incorrectos podem ser originados por uma incorrecta colheita de amostras, incumprimento dos procedimentos recomendados para colheita, manuseamento e conservação de amostras, erro técnico, troca de amostras ou porque o número de organismos na amostra é demasiado baixo para ser detectado pelo teste. Para se evitarem resultados incorrectos, é necessária uma cuidadosa conformidade com as instruções deste folheto.
- Dado que a detecção das sequências de genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP-1} depende do número de organismos presentes na amostra, os resultados fiáveis dependem da colheita, manuseamento e conservação correctas da amostra.
- Um resultado positivo do teste não indica necessariamente a presença de organismos viáveis.
- Os testes com o Xpert Carba-R Assay devem ser utilizados como auxiliares de outros métodos disponíveis.
- Mutações ou polimorfismos nas regiões de ligação do iniciador ou da sonda podem afectar a detecção de variantes novas ou desconhecidas de *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP-1}, originando um resultado falso negativo.
- Numa cultura mista contendo organismos que tenham mais do que uma das cinco sequências do gene alvo, o LoD do ensaio pode variar, principalmente quando se encontra presente uma concentração extremamente elevada de uma ou mais das cinco sequências de genes.
- Tal como com todos os testes para diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, podem ser detectados níveis extremamente baixos do alvo inferiores ao LoD do ensaio, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Os resultados do Xpert Carba-R Assay podem por vezes ser **INVÁLIDO**, devido a uma falha do controlo SPC, **ERRO** ou **SEM RESULTADO**, sendo necessária a repetição do teste, o que poderá atrasar a obtenção de resultados finais.

15 Características do desempenho

As características do desempenho do ensaio Xpert Carba-R Assay foram avaliadas num estudo prospectivo multicêntrico em duas instituições dos EUA e em duas instituições da Europa (UE). Devido à baixa prevalência de organismos que contêm genes resistentes a carbapenemos na ausência de um surto, e à dificuldade de se obterem amostras frescas que contenham organismos não susceptíveis a carbapenemos, as amostras prospectivas colhidas para este estudo foram suplementadas com amostras manipuladas (isolados bem caracterizados adicionados na matriz da zaragatoa rectal negativa).

Foram incluídos indivíduos cujos cuidados de rotina incluíram a colheita de amostras de zaragatoa rectal para o rastreio de organismos resistentes a carbapenemos, ou indivíduos que deram o consentimento informado. Foi utilizado um conjunto de zaragatoa dupla para a colheita das amostras rectais dos indivíduos elegíveis. Utilizou-se uma zaragatoa do conjunto para a cultura de referência e teste de susceptibilidade; a outra zaragatoa foi utilizada para teste com o ensaio Xpert Carba-R Assay. O ADN de todos os isolados não susceptíveis a carbapenemos foi extraído e enviado para um laboratório independente para identificação da sequência de ADN. O tratamento do doente continuou no local de acordo com a prática padrão.

Os testes de susceptibilidade foram realizados de acordo com os documentos M2-A11, M7-A9 e M100-S23 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).^{13,14,15} Utilizaram-se discos de meropenem no teste de difusão do disco para detecção de resistência aos carbapenemos.

Os resultados do ensaio Xpert Carba-R Assay foram comparados com a cultura de referência e o sequenciamento para isolados não susceptíveis a carbapenemos confirmados por cultura.

Foram testadas um total de 633 amostras com o ensaio Xpert Carba-R Assay para as sequências de genes resistentes a carbapenemos alvo (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP-1}) e através do método de referência. Relativamente ao método de referência, o ensaio Xpert Carba-R Assay demonstrou uma sensibilidade e especificidade globais de 96,6% (95% CI: 92,2–98,9) e 98,6% (95% CI: 97,1–99,4), respectivamente (Tabela 2) no conjunto combinado de amostras manipuladas e prospectivas. Os resultados do ensaio Xpert Carba-R Assay foram definidos como positivos se uma ou mais das cinco sequências alvo foram detectadas, e como negativos se nenhum dos alvos foi detectado.

Tabela 2. Desempenho global do Xpert Carba-R vs. cultura de referência + sequenciamento

Xpert Carba-R	Cultura + Sequenciamento			
		Pos	Neg	Total
	Pos	142	7	149
	Neg	5	479	484
	Total	147	486	633
Sensibilidade: 96,6% (95% CI: 92,2–98,9) Especificidade: 98,6% (95% CI: 97,1–99,4)				

A Tabela 3 indica o valor preditivo positivo (VPP), o valor preditivo negativo (VPN) e estimativas de exactidão do ensaio Xpert Carba-R Assay como uma função da prevalência.

Tabela 3. Os VPP e VPN globais e as estimativas de exactidão do ensaio Xpert Carba-R Assay como uma função da prevalência

Prevalência	VPP	VPN	Exactidão
0,00%	0,00%	100,00%	98,56%
10,00%	88,17%	99,62%	98,36%
20,00%	94,37%	99,14%	98,17%
30,00%	96,64%	98,54%	97,97%
40,00%	97,81%	97,75%	97,78%
50,00%	98,53%	96,66%	97,58%
60,00%	99,02%	95,08%	97,38%
70,00%	99,37%	92,55%	97,19%
80,00%	99,63%	87,87%	96,99%
90,00%	99,83%	76,30%	96,79%
100,00%	100,00%	0,00%	96,60%

A Tabela 4 apresenta um quadro dos resultados do ensaio Xpert Carba-R Assay por alvo individual para todas as amostras. Verificou-se um total de 633 amostras, cada uma com resultados para cinco alvos individuais para um total de 3165 resultados.

Tabela 4. Tabela do ensaio Xpert Carba-R Assay de todos os resultados por alvo individual

Xpert Carba-R	Cultura + Sequenciamento							
		IMP-1+	VIM+	NDM+	KPC+	OXA-48+	NEG (Negativo)	Total
	IMP-1+	26	0	0	0	0	0	26
	VIM+	0	29	0	0	0	1	30
	NDM+	0	0	26	0	0	1	27
	KPC+	0	0	0	29	0	4	33
	OXA-48+	0	0	0	0	38	1	39
	NEG (Negativo)	1	2	0	1	2	3004 ^a	3010
	Total	27	31	26	30	40	3011	3165

- a. Os pares negativos (3004 no total) foram decompostos do seguinte modo: 606 ambos os testes IMP-1 e NEG; 601 ambos os testes VIM e NEG; 606 ambos os testes NDM e NEG; 599 ambos os testes KPC e NEG; 592 ambos os testes OXA-48 e NEG.

Relativamente ao método de referência, o ensaio Xpert Carba-R Assay demonstrou uma sensibilidade e uma especificidade para o alvo IMP-1 de 96,3% e 100%, respectivamente. Ver Tabela 5.

Tabela 5. Desempenho do ensaio Xpert Carba-R Assay—IMP-1

	Cultura + Sequenciamento			
		Pos	Neg	Total
Xpert Carba-R	Pos	26	0	26
	Neg	1	606	607
	Total	27	606	633
	Sensibilidade: 96,3% (95% CI: 81,0–99,9) Especificidade: 100% (95% CI: 99,4–100)			

Relativamente ao método de referência, o ensaio Xpert Carba-R Assay demonstrou uma sensibilidade e uma especificidade para o alvo VIM de 93,5% e 99,8%, respectivamente. Ver Tabela 6.

Tabela 6. Desempenho do ensaio Xpert Carba-R Assay—VIM

	Cultura + Sequenciamento			
		Pos	Neg	Total
Xpert Carba-R	Pos	29	1	30
	Neg	2	601	603
	Total	31	602	633
	Sensibilidade: 93,5% (95% CI: 78,6–99,2) Especificidade: 99,8% (95% CI: 99,1–100)			

Relativamente ao método de referência, o ensaio Xpert Carba-R Assay demonstrou uma sensibilidade e uma especificidade para o alvo NDM de 100% e 99,8%, respectivamente. Ver Tabela 7.

Tabela 7. Desempenho do ensaio Xpert Carba-R Assay—NDM

	Cultura + Sequenciamento			
		Pos	Neg	Total
Xpert Carba-R	Pos	26	1	27
	Neg	0	606	606
	Total	26	607	633
	Sensibilidade: 100% (95% CI: 86,8–100) Especificidade: 99,8% (95% CI: 99,1–100)			

Relativamente ao método de referência, o ensaio Xpert Carba-R Assay demonstrou uma sensibilidade e uma especificidade para o alvo KPC de 96,7% e 99,3%, respectivamente. Ver Tabela 8.

Tabela 8. Desempenho do ensaio Xpert Carba-R Assay—KPC

	Cultura + Sequenciamento			
		Pos	Neg	Total
Xpert Carba-R	Pos	29	4	33
	Neg	1	599	600
	Total	30	603	633
	Sensibilidade: 96,7% (95% CI: 82,8–99,9) Especificidade: 99,3% (95% CI: 98,3–99,8)			

Relativamente ao método de referência, o ensaio Xpert Carba-R Assay demonstrou uma sensibilidade e uma especificidade para o alvo OXA-48 de 95,0% e 99,8%, respectivamente. Ver Tabela 9.

Tabela 9. Desempenho do ensaio Xpert Carba-R Assay—OXA-48

Xpert Carba-R	Cultura + Sequenciamento			
		Pos	Neg	Total
	Pos	38	1	39
	Neg	2	592	594
	Total	40	593	633
Sensibilidade: 95,0% (95% CI: 83,1–99,4) Especificidade: 99,8% (95% CI: 99,1–100)				

16 Desempenho analítico

16.1 Sensibilidade analítica (Limite de detecção)

Realizaram-se estudos para determinar o limite de detecção (LoD) analítico do ensaio Xpert Carba-R Assay com organismos produtores de carbapenemases introduzidos na matriz de zaragatoa rectal agrupada humana natural negativa. O LoD foi determinado para duas bactérias produtoras de carbapenemases para cada analito do gene, ou seja, os genes que codificam KPC, NDM, VIM, OXA-48 e IMP-1. As bactérias foram tituladas por contagens de placas e diluídas na matriz de zaragatoa rectal agrupada negativa. Foram avaliadas réplicas de 20 a um mínimo de seis concentrações diferentes e os LoD foram estimados através de análise Probit. Para este estudo, o LoD estimado é definido como a concentração mais baixa de células alvo que podem ser reproduzidas e distinguidas das amostras negativas com uma confiança de 95%. O estudo foi realizado com dois lotes diferentes de reagentes Xpert Carba-R e o LoD reivindicado é o mais elevado das duas determinações. Os LoD estimados foram verificados preparando e testando 10 réplicas de duas diluições independentes de cada bactéria a cada LoD estimado.

Em todos os casos, o CI de 95% unilateral superior da proporção que foi positiva foi superior a 95%, ou seja, $\geq 19/20$.

A reivindicação de LoD para cada par de organismos produtores de carbapenemases é indicada na Tabela 10.

Tabela 10. LoD para organismos produtores de carbapenemases

Organismo	ID da estirpe	LoD (UFC/zaragatoa)
KPC <i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	348
KPC <i>Enterobacter cloacae</i>	C8823	750
NDM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-2146	246
NDM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	C8658	306
OXA-48 <i>Escherichia coli</i>	OM22	213
OXA-48 <i>Enterobacter cloacae</i>	501	451
IMP-1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	695	1165
IMP-1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMPBMI	258
VIM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	C8667	274
VIM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C10107	118

16.2 Reactividade analítica (Inclusividade)

A sensibilidade analítica do ensaio Xpert Carba-R Assay foi avaliada testando um painel de 60 amostras que consistiam em 20 estirpes bacterianas bem caracterizadas quanto ao alvo *bla*_{OXA-48} (o qual inclui as variantes *bla*_{OXA-181/232}) e 10 estirpes bacterianas bem caracterizadas quanto a cada um dos outros quatro alvos do Carba-R. Ver Tabela 11. Os organismos foram testados em triplicado na matriz de zaragatoa rectal negativa agrupada. Todos os organismos foram testados perto do limite de detecção (LoD) analítico e as concentrações foram confirmadas através de cultura em placas em meios não selectivos em triplicado e determinando contagens viáveis. Sob as condições deste estudo, as 60 estirpes bacterianas foram detectadas com o ensaio Xpert Carba-R Assay. A inclusividade foi de 100%.

Tabela 11. Lista de organismos produtores de carbapenemases e concentrações (UFC/ml) testadas utilizando o ensaio Xpert Carba-R Assay

Organismo	ID da estirpe	Característica confirmada	Concentração do teste (UFC/ml)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC-3	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31551	KPC-4	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-1705	KPC	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	COL	KPC-2	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	KBM18	KPC-2	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BM9	KPC-3	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA3	KPC-2	100
<i>Serratia marcescens</i>	CGNC	KPC-2	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	CFVL	KPC-2	100
<i>Escherichia coli</i>	COL	KPC-2	100
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13476	IMP	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	695	IMP-1	450
<i>Enterobacter cloacae</i>	2340	IMP-1	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMPBMI	IMP	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Yonsei_1	IMP	500
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Yonsei_2	IMP	500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6852	IMP-1	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MKAM	IMP-1	200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70450-1	IMP	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3994	IMP-10	200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 13437	VIM-10	400
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13439	VIM-1	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13440	VIM-1	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	758	VIM	400
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PA_87	VIM	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B92A	VIM	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Col1	VIM-2	400
<i>Serratia marcescens</i>	BM19	VIM-2	100
<i>Escherichia coli</i>	KOW7	VIM-4	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DIH	VIM-19	200
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13443	NDM-1	100

Tabela 11. Lista de organismos produtores de carbapenemases e concentrações (UFC/ml) testadas utilizando o ensaio Xpert Carba-R Assay (Continuação)

Organismo	ID da estirpe	Característica confirmada	Concentração do teste (UFC/ml)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-2146	NDM-1	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34262	NDM	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AB-GEN	NDM-1	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	3047	NDM-1	100
<i>Proteus mirabilis</i>	7892	NDM-1	100
<i>Salmonella spp.</i>	CAN	NDM-1	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	EGY	NDM-2	100
<i>Escherichia coli</i>	I5	NDM-4	100
<i>Escherichia coli</i>	405	NDM-5	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13442	OXA-48	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OM11	OXA-48	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	501	OXA-48	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DUW	OXA-48	100
<i>Escherichia coli</i>	OM22	OXA-48	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	BOU	OXA-48	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	TUR	OXA-48	100
<i>Escherichia coli</i>	11670	OXA-48	100
<i>Escherichia coli</i>	AME	OXA-48	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11978	OXA-48	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	166643	OXA-181	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	42194	OXA-181	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MSH2014-6	OXA-181	150
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MSH2014-44	OXA-181	200
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MSH2014-64	OXA-181	150
<i>Escherichia coli</i>	MSH2014-72	OXA-181	100
<i>Escherichia coli</i>	MSH2014-73	OXA-181	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MSH2014-18	OXA-232	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MSH2014-51	OXA-232	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MSH2014-75	OXA-232	50

16.3 Reactividade cruzada analítica (Exclusividade)

A especificidade analítica do ensaio Xpert Carba-R Assay foi avaliada testando um painel de 54 amostras que consistiram em 22 estirpes bacterianas bem caracterizadas de perfis de resistência relacionados (ver Tabela 12), 28 estirpes bacterianas bem caracterizadas que representam agentes patogénicos ou não patogénicos comuns potencialmente encontrados no tracto gastrointestinal (ver Tabela 13), três organismos que constituem vírus potencialmente presentes no tracto gastrointestinal (ver Tabela 13), e uma linha celular de carcinoma da bexiga para representação do ADN genómico humano (ver Tabela 14).

Todas as estirpes bacterianas foram cultivadas e tituladas. As estirpes foram testadas a concentrações $\geq 10^5$ UFC/ml. O adenovírus e o enterovírus foram testados a concentrações $\geq 10^5$ TCID₅₀/ml; o norovírus foi testado como uma amostra clínica positiva de norovírus a uma concentração de $2,5 \times 10^7$ cópias de ARN/ml. A linha celular da bexiga (ADN genómico humano) foi testada a 1×10^5 células/ml. Os organismos foram diluídos na matriz de zaragatoa rectal negativa agrupada e testados em triplicado. Nenhum dos 54 organismos potencialmente com reactividade cruzada e ácidos nucleicos foram detectados com o ensaio Xpert Carba-R Assay. Incluíram-se no estudo controlos positivos e negativos. A especificidade analítica foi de 100%.

Tabela 12. Lista de organismos de resistência relacionada

Nome do organismo	Beta-lactamases presentes	Concentração do teste (UFC/ml)
<i>Escherichia coli</i>	CTX-M (15)	$5,0 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M (25)	$7,5 \times 10^7$
<i>Enterobacter cloacae</i>	Deficiência de OmpC/OmpF	$9,9 \times 10^7$
<i>Citrobacter freundii</i>	TEM (WT+164S)	$7,3 \times 10^7$
<i>Enterobacter cloacae</i>	AmpC (ACT/MIR)	$4,9 \times 10^7$
<i>Escherichia coli</i>	CTX-M (2); TEM; OXA-2	$1,3 \times 10^7$
<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M (2); TEM	$9,5 \times 10^7$
<i>Serratia marcescens</i>	CTX-M (2); TEM	$2,2 \times 10^7$
<i>Morganella morganii</i>	CTX-M (2); TEM	$9,3 \times 10^7$
<i>Proteus mirabilis</i>	CTX-M (2); TEM	$8,2 \times 10^7$
<i>Salmonella spp.</i>	CTX-M (U)	$7,8 \times 10^7$
<i>Shigella flexnerii</i>	CTX-M (2); TEM	$3,8 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV	$4,1 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-13; CTX-M; SHV-1	$8,8 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M (15); SHV-11; TEM-1	$3,8 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M (15); SHV	$5,3 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV-27	$8,3 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV (-5, -55); TEM	$5,8 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M (15); SHV; TEM	$6,4 \times 10^7$
<i>Enterobacter aerogenes</i>	SHV (WT+238S+240K)	$6,5 \times 10^7$
<i>Enterobacter aerogenes</i>	SHV (WT+238S+240K)	$9,0 \times 10^7$
<i>Escherichia coli</i>	AmpC (CMY II); TEM	$8,0 \times 10^8$

Tabela 13. Lista de microrganismos comensais e outros microrganismos entéricos

Nome do organismo	Fonte	Concentração do teste (UFC/ml)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	$6,1 \times 10^7$
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	$2,0 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	$6,0 \times 10^7$
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	$9,8 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	$1,3 \times 10^8$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	$2,9 \times 10^7$
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 700621	$5,2 \times 10^7$
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 9756	$6,8 \times 10^7$
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 13182	$8,0 \times 10^7$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC BAA-747	$2,2 \times 10^7$
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 33128	$9,4 \times 10^7$
<i>Morganella morganii</i>	ATCC 49948	$1,2 \times 10^7$
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 51331	$4,9 \times 10^7$
<i>Citrobacter koseri</i>	ATCC 27028	$> 1,5 \times 10^8$
<i>Providencia stuartii</i>	ATCC 49809	$5,3 \times 10^7$
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CCUG 29780/ATCC 12401	$3,1 \times 10^7$
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 51697	$7,8 \times 10^7$
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 43071	$3,4 \times 10^7$
<i>Acinetobacter spp.</i>	CCUG 34787	$1,6 \times 10^7$
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CCUG 24604	$2,3 \times 10^7$
<i>Campylobacter jejuni</i>	CCUG 43594/ATCC 33560	$1,5 \times 10^6$
<i>Citrobacter freundii</i>	CCUG 418	$> 1,5 \times 10^8$
<i>Clostridium difficile</i> (não toxigénico)	ATCC 700057	$4,5 \times 10^7$
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	CCUG 33629	$4,0 \times 10^7$
<i>Helicobacter pylori</i>	CCUG 17874	$1,3 \times 10^7$
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCUG 33548	$> 1,5 \times 10^8$
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	CCUG 7835	$5,0 \times 10^5$
<i>Providencia alcalifaciens</i>	CCUG 6325	$7,8 \times 10^7$
<i>Adenovírus B Tipo 7A/NY</i>	MRVP/Zeptomatrix	$1,4 \times 10^5$ TCID ₅₀ /ml
<i>Enterovírus tipo 71/NY</i>	MRVP/Zeptomatrix	$4,4 \times 10^5$ TCID ₅₀ /ml
<i>Norovírus GI</i>	Amostra clínica—Cepheid Solna	$2,5 \times 10^7$ cópias de ARN/ml

Tabela 14. Linha celular que representa o ADN genómico humano

Nome do organismo	Fonte	Concentração do teste (células/ml)
Carcinoma celular da bexiga (hgDNA)	ATCC HTB-4	$1,0 \times 10^5$

16.4 Substâncias que podem interferir

Num estudo não clínico, foram avaliadas 23 substâncias que podem interferir e que podem estar presentes em amostras de zaragatoa rectais com o ensaio Xpert Carba-R Assay. Foram preparadas e testadas soluções de substâncias que podem interferir às concentrações indicadas na Tabela 15. Foram testadas oito amostras negativas de réplicas por substância para determinar o efeito sobre o desempenho do controlo de processamento da amostra (SPC).

Para determinar se a presença de substâncias que podem interferir causaram resultados falsos negativos, foram testadas oito amostras positivas de réplicas por substância. Os positivos consistiram numa mistura de cinco organismos produtores de carbapenemases a concentrações de 2–4x LoD analítico previamente determinadas para cada organismo. As substâncias e organismos foram diluídos em reagente de amostra para teste.

O efeito de cada substância que pode interferir em réplicas positivas e negativas foi avaliado comparando os valores limite do ciclo (Ct) alvo gerados na presença da substância para valores Ct dos controlos do reagente de amostra a que faltava a substância.

Na presença das 23 substâncias que podem interferir, não se observou qualquer resultado inválido causado pela inibição do SPC em amostras negativas. Das 23 substâncias que podem interferir testadas, o Pepto-Bismol (subsalicilato de bismuto) 0,25% p/v apresentou um efeito inibidor estatisticamente significativo na detecção de IMP-1 no ensaio Xpert Carba-R Assay. Não foram observados outros efeitos inibidores estatisticamente significativos.

Tabela 15. Substâncias que podem interferir testadas

Substância/Classe	Ingrediente activo	Concentração testada
Medicação anti-inflamatória não esteróide	Naproxeno	0,25% p/v
Composto para imagiologia	Sulfato de bário	0,25% p/v
Antibiótico (oral)	Cefalexina	0,25% p/v
	Ciprofloxacina	0,25% p/v
Antibiótico (tópico)	Polimixina B/Neomicina/Bacitracina	0,25% p/v
Cremes/pomada/supositórios	Hidrocortisona	0,25% p/v
Laxante	Senosídeos	0,25% p/v
Clisteres	Óleo mineral	0,25% p/v
Antidiarreicos	Cloridrato de loperamida	0,25% p/v
	Subsalicilato de bismuto (2)	0,25% p/v
Creme tópico	Gluconato de clorhexidina e Metil hidroxibenzoato	0,25% p/v
	Vaselina	0,25% p/v
Antiácidos	Carbonato de cálcio/hidróxido de alumínio/hidróxido de magnésio/simeticona	0,25% p/v
	Cimetidina	0,25% p/v
	Famotidina	0,25% p/v
Redutor de ácidos; antiácido	Omeprazole	0,25% p/v
Antifúngico/anti-prurido Vaginal	Nistatina	0,25% p/v
	Benzocaína, resorcinol	0,25% p/v
Cremes/pomadas anti-hemorroidais	Fenilefrina	0,25% p/v
Clisteres	Soro fisiológico	0,25% p/v
Preservativo com lubrificante espermicida	Nonoxinol-9	1 preservativo ^a
Toalhetes húmidos	Cloreto de benzalcónio em etanol	1 unidade ^b

a. Um preservativo adicionado a 40 ml de reagente de amostra.

b. Uma unidade 12,7 x 19 cm adicionada a 40 ml de reagente de amostra.

16.5 Estudo de contaminação cruzada (carry-over)

Realizou-se um estudo para demonstrar que os cartuchos GeneXpert autónomos de utilização única impedem a contaminação cruzada em amostras negativas. O estudo consistiu numa amostra negativa processada no mesmo módulo GeneXpert imediatamente após uma amostra muito positiva. A amostra altamente positiva é constituída por células de *E. coli* inactivadas com um plasmídeo com um acessório que consiste num oligonucleótido sintético das sequências de amplificação de cinco genes de analito alvo do Xpert Carba-R. Células positivas foram diluídas na matriz de zaragatoa rectal negativa agrupada até uma concentração de 1×10^6 UFC/ml. O esquema do teste foi repetido 20 vezes em dois módulos GeneXpert para um total de 102 testes (25 amostras altamente positivas por módulo e 26 amostras negativas por módulo). As 50 amostras positivas reportaram correctamente todos os alvos do Xpert Carba-R como **DETECTADO**. As 52 amostras negativas reportaram correctamente todos os alvos do Xpert Carba-R como **NÃO DETECTADO**.

16.6 Reprodutibilidade do ensaio

A reprodutibilidade do ensaio Xpert Carba-R Assay foi avaliada num estudo multicêntrico de cinco dias no qual dois operadores em cada um dos três centros testaram em ocultação um painel de precisão de 11 membros. Cada membro do painel foi testado em réplicas de três para um total de 90 réplicas por membro do painel. Este painel foi constituído por isolados bem caracterizados adicionados na matriz de zaragatoa rectal negativa. Os dados foram resumidos por alvo do ensaio. Ver Tabela 16 e Tabela 17.

Tabela 16. Resumo dos resultados de reprodutibilidade—% de concordância por local/operador do estudo

Preparação	Local 1		Local 2		Local 3		% de concordância total por amostra
	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
KPC pos baixo	80,00% (12/15)	86,70% (13/15)	80,00% (12/15)	93,30% (14/15)	86,70% (13/15)	93,30% (14/15)	86,7% (78/90)
KPC pos mod	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (90/90)
VIM pos baixo	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	93,30% (14/15)	86,70% (13/15)	96,7% (87/90)
VIM pos mod	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (90/90)
NDM pos baixo	100% (15/15)	100% (15/15)	73,30% (11/15)	86,70% (13/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	93,3% (84/90)
NDM pos mod	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (90/90)
OXA-48 pos baixo	100% (15/15)	86,70% (13/15)	80,00% (12/15)	86,70% (13/15)	93,30% (14/15)	86,70% (13/15)	88,9% (80/90)
OXA-48 pos mod	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (90/90)
IMP-1 pos baixo	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	86,70% (13/15)	86,70% (13/15)	100% (15/15)	95,6% (86/90)
IMP-1 pos mod	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (90/90)
Neg	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (90/90)

Tabela 17. Resumo dos dados de reprodutibilidade^a

Preparação	Canal de ensaio (analito específico)	N ^b	Ct médio	Entre locais		Entre dias		Entre operadores		Dentro do ensaio		Total	
				DP ^c	CV ^d (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
KPC pos baixo	KPC	84	36,1	0,13	0,4	0	0	0,08	0,2	1,14	3,2	1,15	3,2
KPC pos mod	KPC	90	34,0	0	0	0,21	0,6	0,15	0,4	0,53	1,6	0,59	1,7
VIM pos baixo	VIM	89	35,0	0,35	1	0	0	0,28	0,8	1,08	3,1	1,17	3,4
VIM pos mod	VIM	90	31,6	0,15	0,5	0	0	0,18	0,6	0,34	1,1	0,41	1,3
NDM pos baixo	NDM	87	35,8	0,16	0,4	0,07	0,2	0,17	0,5	0,86	2,4	0,89	2,5
NDM pos mod	NDM	90	33,2	0	0	0,13	0,4	0	0	0,58	1,8	0,60	1,8
OXA-48 pos baixo	OXA-48	87	36,6	0	0	0	0	0	0	0,99	2,7	0,99	2,7
OXA-48 pos mod	OXA-48	90	32,4	0,09	0,3	0	0	0	0	0,37	1,1	0,38	1,2
IMP-1 pos baixo	IMP-1	89	36,1	0	0	0,13	0,4	0,29	0,8	0,89	2,5	0,95	2,6
IMP-1 pos mod	IMP-1	90	33,7	0,04	0,1	0,09	0,3	0,15	0,4	0,49	1,5	0,52	1,5
Neg	SPC	90	33	0	0	0	0	0,27	0,8	0,63	1,9	0,69	2,1

- a. A variabilidade de alguns factores pode ser numericamente negativa, o que poderá ocorrer se a variabilidade devido a esses factores for muito reduzida. Quando isto ocorre, a variabilidade, consoante medida com DP e CV, é definida como 0.
- b. Resultados com valores do Ct diferentes de zero em 90.
- c. DP = desvio padrão.
- d. CV = coeficiente de variação.

17 Referências

1. Kallen AJ, et al. 2010. Current epidemiology of multidrug-resistant gram-negative bacilli in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 31 Suppl 1: S51–54.
2. Nordmann P, et al. Cornaglia. 2012. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! *Clin Microbiol Infect.* 18: 411–412.
3. Cornaglia G, et al. 2011. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis.* 11: 381–393.
4. Kitchel B, et al. 2009. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the United States: Clonal expansion of MLST sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:3365–3370.
5. Schwaber MJ, et al. 2011. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis.* 52: 848–855.
6. Kumarasamy KK, et al. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 10: 597–602.
7. Cuzon G, et al. 2008. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 3463–3464.
8. Nordmann P, et al. 2011. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 17: 1791–1798.
9. Grundmann H, et al. 2010. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 15.
10. Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Guidance for Control of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE)—2012 CRE Tool kit. Edited by Department of Health and Human Services, <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-toolkit/index.html>.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories (refer to latest edition). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
13. CLSI M100-S23. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-third informational supplement, CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA.
14. CLSI M7-A9. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Ninth Edition, CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA.
15. CLSI M2-A11. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Eleventh Edition, CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA.

18 Locais das sedes da Cepheid

Sede corporativa	Sede europeia
Cepheid 904 Caribbean Drive Sunnyvale, CA 94089-1189 EUA	Cepheid Europe SAS Vira Solelh 81470 Maurens-Scopont França
Telefone: +1 408.541.4191	Telefone: +33 563 825 300
Fax: +1 408.541.4192	Fax: +33 563 825 301
www.cepheid.com	www.cepheidinternational.com

19 Assistência Técnica

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

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

Região	Telefone	E-mail:
EUA	+1 888.838.3222	TechSupport@cepheid.com
França	+33 563 825 319	Support@cepheideurope.com
Alemanha	+49 69 710 480 480	Support@cepheideurope.com
Reino Unido	+44 3303 332 533	Support@cepheideurope.com
África do Sul	+27 861 22 76 35	Support@cepheideurope.com
Outros países da Europa, do Médio Oriente e de África	+33 563 825 319 +971 4 253 3218	Support@cepheideurope.com
Austrália, Nova Zelândia	+61 1800 107 884	Support@cepheideurope.com
Outros países não indicados acima	+1 408.400.8495	TechSupport@cepheid.com

As informações de contacto para outros escritórios da Cepheid estão disponíveis no nosso website em www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com no separador **SUPPORT** (APOIO). Seleccione a opção **Contact Us** (Contacte-nos).

20 Tabela de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Não reutilizar
	Código do lote
	Consulte as instruções de utilização
	Cuidado
	Fabricante
	Contém suficiente para <n> testes
	Controlo
	Prazo de validade
	Marca CE – Conformidade Europeia
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Limites de temperatura
	Riscos biológicos
	Advertência



Cepheid
 904 Caribbean Drive
 Sunnyvale, CA 94089
 EUA
 Telefone: +1.408.541.4191
 Fax: +1.408.541.4192



Cepheid Europe SAS
 Vira Soleih
 81470 Maurens-Scopont
 França
 Telefone: +33 563 825 300
 Fax: +33 563 825 301



