

Xpert[®] Ebola

REF GXEBOLA-CE-10
GXEBOLA-CE-50

Trademark, Patents and Copyright Statements

Cepheid[®], the Cepheid logo, GeneXpert[®], and Xpert[®] are trademarks of Cepheid, registered in the U.S. and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

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

© 2015-2022 Cepheid.

Declarações relativas a marcas registadas, patentes e copyright

Cepheid[®], o logótipo da Cepheid, GeneXpert[®], e Xpert[®] são marcas comerciais da Cepheid, registadas nos EUA e noutros países.

Todas as restantes marcas comerciais pertencem aos respetivos proprietários.

A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO ATRIBUI AO COMPRADOR O DIREITO NÃO TRANSFERÍVEL DE O UTILIZAR DE ACORDO COM ESTAS INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO. NENHUNS OUTROS DIREITOS SÃO ATRIBUÍDOS EXPRESSAMENTE, POR IMPLICAÇÃO OU POR PRECLUSÃO. ALÉM DISSO, NÃO SE CONFEREM NENHUNS DIREITOS DE REVENDA COM A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO.

© 2015-2022 Cepheid.



Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Sweden

Xpert[®] Ebola

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.

1 Nome proprietário

Xpert[®] Ebola

2 Nome comum ou usual

Xpert Ebola Assay (Ensaio Xpert Ebola)

3 Utilização prevista

O ensaio Xpert Ebola é um teste de transcrição reversa/reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real destinado à detecção qualitativa de ARN do vírus Ébola Zaire (detectado no surto de 2014 na África Ocidental) em sangue total venoso com EDTA, sangue periférico obtido por punção digital ou zaragatoa bucal de indivíduos com sinais e sintomas de doença por vírus Ébola (EVD), juntamente com factores de risco epidemiológico.

Não se devem realizar testes com o ensaio Xpert Ebola se o indivíduo não corresponder aos critérios clínicos e epidemiológicos para a realização de testes em casos suspeitos.

Os resultados destinam-se à identificação presumível do vírus Ébola Zaire. A identificação definitiva da infecção por vírus Ébola Zaire exige a realização de testes e procedimentos de confirmação adicionais, consultando as autoridades de saúde pública ou outras autoridades que tenham de ser notificadas. Para além da identificação do vírus Ébola Zaire, o diagnóstico de infecção por vírus Ébola Zaire tem de ser efectuado com base no historial, nos sinais, nos sintomas, na probabilidade de exposição e noutras evidências laboratoriais.

Os resultados negativos não excluem a infecção por vírus Ébola Zaire ou outros vírus Ébola e não devem ser utilizados como a única base para decisões sobre o tratamento dos pacientes.

Desconhece-se o nível do vírus Ébola presente no sangue e na zaragatoa bucal de indivíduos com infecção sistémica precoce. Como é difícil obter amostras clínicas positivas para Ébola, o ensaio Xpert Ebola foi avaliado com números limitados de amostras artificiais contaminadas com vírus Ébola Zaire vivo ou ARN de vírus Ébola Zaire. O ensaio não foi avaliado com sangue e zaragatoa bucal de indivíduos com infecção por vírus Ébola Zaire.

Notificação das autoridades de saúde pública: Os organismos de saúde pública locais e nacionais devem ser notificados sobre qualquer paciente que se suspeite ter EVD. São necessários testes de confirmação no laboratório de saúde pública para se obterem resultados de detecção positivos, podendo também ser necessários para resultados de detecção negativos. Os laboratórios devem consultar as autoridades de saúde pública locais ou nacionais sobre qualquer resultado positivo ou negativo do teste Xpert Ebola, em relação à necessidade de testes adicionais e ao transporte adequado das amostras.

4 Resumo e explicação

A doença por vírus Ébola (EVD) tem ocorrido esporadicamente em toda a África Ocidental, tendo havido surtos ao longo de décadas, mas a epidemia actual é a maior até à data. Em Março de 2015, existiam mais de 24 000 indivíduos infectados e mais de 10 000 óbitos resultantes. A EVD alastrou-se agora para além de África, para os EUA e a Europa. O ónus para os profissionais de cuidados de saúde nas áreas endémicas é também significativo, verificando-se uma taxa de mortalidade superior a 50%.¹ Desde a primeira descoberta do vírus Ébola, em 1976, descreveram-se cinco espécies de Ébola: vírus Ébola Zaire, Sudão, Costa do Marfim (floresta Tai), Bundibugyo e Reston. Entre estas espécies de vírus Ébola, o vírus Ébola Zaire foi o que afectou as áreas geográficas mais abrangentes, sendo a causa do surto recente.

O ensaio Xpert Ebola utiliza tecnologia de RT-PCR para obter uma elevada sensibilidade na detecção qualitativa de ácidos nucleicos totais de vírus Ébola Zaire em amostras.

Para garantir uma detecção exacta, o ensaio Xpert Ebola foi concebido para detectar gene de glicoproteína (GP) e/ou gene de nucleoproteína (NP). Pensa-se que cada alvo está presente em 100% dos vírus Ébola Zaire conhecidos.

5 Princípio do procedimento

O ensaio Xpert Ebola é um teste rápido e automatizado para a detecção qualitativa do vírus Ébola Zaire. O ensaio é realizado nos sistemas do instrumento GeneXpert da Cepheid.

Os sistemas do instrumento GeneXpert automatizam e integram a preparação de amostras, a amplificação de ácidos nucleicos e a detecção da sequência-alvo em amostras simples ou complexas, utilizando transcrição reversa/PCR em tempo real. Os sistemas são constituídos por um instrumento, um computador e software pré-instalado para execução de testes e visualização dos resultados. Os sistemas exigem a utilização de cartuchos GeneXpert descartáveis de utilização única que contêm os reagentes de transcrição reversa/PCR em tempo real e onde decorrem os processos de transcrição reversa em tempo real. Dado que os cartuchos são independentes, é minimizada a contaminação cruzada entre amostras. Para obter uma descrição completa dos sistemas, consulte o *manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* ou o *manual do utilizador do sistema GeneXpert Infinity* adequado.

O ensaio Xpert Ebola inclui reagentes para a detecção de ácidos nucleicos totais de vírus Ébola Zaire em amostras, bem como um controlo de adequação da amostra e um controlo interno para garantir a adição adequada da amostra, o processamento adequado do alvo e a monitorização da presença de inibidor(es) nas reacções de transcrição reversa e PCR. O controlo de verificação da sonda (PCC — Probe Check Control) verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo de PCR no cartucho, a integridade da sonda e a estabilidade do corante.

6 Reagentes e instrumentos

6.1 Materiais fornecidos



Os kits do ensaio Xpert Ebola contêm reagentes suficientes para processar 10 ou 50 amostras ou amostras de controlo de qualidade. Os kits contêm o seguinte:

Cartuchos do ensaio GeneXpert Ebola com tubos de reacção integrados

- Esfera 1, Esfera 2 e Esfera 3 (liofilizadas)
- Reagente de enxaguamento
- Reagente de eluição
- Reagente de fixação

10 por kit

- 1 de cada por cartucho
- 0,5 ml por cartucho
- 2,0 ml por cartucho
- 2,0 ml por cartucho

50 por kit

- 1 de cada por cartucho
- 0,5 ml por cartucho
- 2,0 ml por cartucho
- 2,0 ml por cartucho

Reagente de amostra para Ébola (Reagente de amostra)

- Reagente de lise (tiocianato de guanidina)

10 frascos por kit

- 10 x 2,5 ml por frasco

50 frascos por kit

- 50 x 2,5 ml por frasco

Pipetas de transferência descartáveis de 1 ml

10 por kit

50 por kit

CD

1 por kit

1 por kit

Nota

As Fichas de Dados de Segurança (FDS) estão disponíveis em www.cephheidinternational.com no separador SUPPORT (ASSISTÊNCIA).

Nota

A soroalbumina bovina (Bovine Serum Albumin, BSA) presente nas esferas deste produto foi produzida e fabricada 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 de origem animal.

7 Conservação e manuseamento



- Conserve os cartuchos e reagentes do ensaio Xpert Ebola entre 2 °C e 28 °C.
- Não utilize nenhum reagente que esteja turvo ou que apresente alteração da cor.
- Não utilize um cartucho com fuga.

8 Materiais necessários mas não fornecidos

- Sistema GeneXpert Dx ou sistemas GeneXpert Infinity (o número de catálogo varia consoante a configuração): Instrumento GeneXpert, computador com software GeneXpert patentado versão 4.4a ou posterior, Xpertise 6.2 ou posterior, leitor de código de barras e manual do utilizador
- Impressora: Caso necessite de uma impressora, contacte a assistência técnica da Cepheid para tratar da aquisição de uma impressora recomendada.
- Zaragoas descartáveis (n.º de catálogo SWAB/E-50)
- Misturador de vórtice
- Lixívia de cloro

9 Advertências e precauções



- Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- 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 Prevention (Centros de Controlo e Prevenção de Doenças) e no Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais).
- Os organismos de saúde pública locais, estaduais e nacionais devem ser notificados sobre qualquer paciente que se suspeite ter doença por vírus Ébola (EVD). São necessários testes de confirmação no laboratório de saúde pública para se obterem resultados de detecção positivos, podendo também ser necessários para resultados de detecção negativos. Os laboratórios devem consultar as autoridades de saúde pública locais ou nacionais sobre qualquer resultado positivo OU negativo (não detecção) no teste para EVD, em relação à necessidade de testes adicionais e ao transporte adequado das amostras.
- Amostras biológicas, dispositivos de transferência e cartuchos usados devem ser considerados como tendo potencial de transmissão de agentes infecciosos que exigem precauções padrão. Siga os procedimentos relativos a resíduos ambientais da sua instituição relativamente à eliminação correta de cartuchos usados e reagentes não usados. Estes materiais podem apresentar características de resíduos químicos perigosos que exigem procedimentos de eliminação nacionais ou regionais específicos. Se as regulamentações nacionais ou regionais não disponibilizarem uma indicação clara sobre a eliminação correta, as amostras biológicas e os cartuchos usados devem ser eliminados de acordo com as directrizes relativas ao manuseamento e à eliminação de resíduos médicos da OMS (Organização Mundial da Saúde).
- Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional com formação, juntamente com uma análise dos sinais e sintomas clínicos e do historial do paciente.
- Este ensaio só deve ser utilizado por profissionais com formação.
- Ao processar mais do que uma amostra de cada vez, comece por abrir apenas um cartucho; adicione a amostra tratada com reagente de amostra e feche o cartucho antes de processar a amostra seguinte. Troque de luvas entre as amostras
- Use luvas descartáveis de protecção, bata e protecção ocular durante o manuseamento de amostras e reagentes. Lave muito bem as mãos após o manuseamento das amostras e dos reagentes do teste.
- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição quando trabalhar com químicos e manusear amostras biológicas.
- Não substitua os reagentes do ensaio Xpert Ebola por outros reagentes.
- Não abra a tampa do cartucho do ensaio Xpert Ebola, excepto quando adicionar a amostra tratada com reagente de amostra.
- Não utilize um cartucho se este parecer húmido ou se o selo da tampa parecer estar partido.
- Não utilize um cartucho que 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 utilize um cartucho que tenha um tubo de reacção danificado.
- Cada cartucho de utilização única do ensaio Xpert Ebola é utilizado para processar apenas um teste. Não reutilize cartuchos gastos.
- A pipeta descartável de utilização única é utilizada para transferir apenas uma amostra. Não reutilize pipetas descartáveis gastas.
- A zaragatoa descartável de utilização única é utilizada para colher e/ou transferir apenas uma amostra. Não reutilize zaragoas descartáveis gastas.
- Conserve o kit do ensaio Xpert Ebola entre 2 °C e 28 °C



Nota Antes de começar, remova o frasco que contém o reagente de amostra do kit e aguarde que este se aclimatize à temperatura ambiente. Consulte a Figura 1. Caso o frasco não tenha sido conservado numa posição vertical, certifique-se de que o tampão está depositado no fundo, agitando bem o frasco.

Nota Use luvas descartáveis. Rotule o frasco de reagente de amostra com a identificação da amostra.

10 Perigos químicos^{2,3}

- ONU
- Palavra-sinal: ATENÇÃO
- **Advertências de perigo GHS da ONU**
 - Nocivo por ingestão
 - Pode ser nocivo em contacto com a pele
 - Causa irritação ocular
- **Recomendações de prudência GHS da ONU**
 - **Prevenção**
 - Lavar cuidadosamente após manuseamento.
 - **Resposta**
 - Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.
 - Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.
 - **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. Continuar a enxaguar.
 - Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

11 Colheita, transporte e conservação de amostras

11.1 Colheita de sangue total



Colha as amostras de sangue total obtidas por punção venosa em tubos com EDTA, seguindo as instruções de utilização do fabricante. O ensaio Xpert Ebola exige 100 µl de sangue total, no mínimo. Em alternativa, utilize a zaragatoa (SWAB/E-50) para colher amostras de sangue obtidas por punção digital. Assegure a absorção de sangue em pelo menos 2/3 da cabeça da zaragatoa. Transfira imediatamente a zaragatoa para o frasco contendo o reagente de amostra (consulte a Figura 1 nas informações relativas à preparação da amostra).

11.2 Zaragatoa bucal

Utilize a zaragatoa (SWAB/E-50) para colher amostras de zaragatoa bucal de acordo com as orientações da OMS para a colheita por zaragatoa oral em pacientes com Ébola.* Evite tocar na ponta da zaragatoa com as luvas ou o contacto com qualquer superfície. No caso de pacientes vivos, peça ao paciente que abra a boca e coloque imediatamente a ponta da zaragatoa no interior da bochecha. Esfregue firmemente com movimentos circulares e pressionando bem durante pelo menos 20 segundos com toda a cabeça da zaragatoa. No caso de pacientes falecidos, coloque a palma da mão no queixo e pressione firmemente para baixo, para abrir ligeiramente a boca. Insira a zaragatoa no interior da bochecha e esfregue firmemente com movimentos circulares e pressionando bem durante pelo menos 20 segundos com toda a cabeça da zaragatoa. Repita para a outra bochecha, caso esteja acessível.

*Número de referência da OMS: WHO/EVD/Guidance/Lab/14.2

Importante Avance imediatamente para o passo de preparação da amostra, para garantir a inactivação do vírus Ébola.

Nota Use luvas descartáveis. Rotule o frasco de reagente de amostra com a identificação da amostra.

Preparação da amostra de Sangue total venoso colhido em tubos com EDTA: Abra a tampa do frasco de reagente de amostra. Transfira 0,1 ml de sangue colocando a zaragatoa (SWAB/E-50) no tubo com EDTA e aguardando que esta absorva sangue durante pelo menos 5 segundos; depois, transfira a amostra inserindo a zaragatoa preparada no frasco de reagente de amostra (consulte a Figura 1). Segure na zaragatoa pela haste e alinhe a ranhura pequena com o bordo do frasco. Parta a zaragatoa dobrando-a para um lado. Em alternativa, utilize uma pipeta automática com pontas de barreira com filtro para transferir 0,1 ml de sangue do tubo com EDTA.

Zaragatoa bucal: Abra a tampa do frasco de reagente de amostra. Insira a zaragatoa preparada no reagente de amostra (consulte a Figura 1). Segure na zaragatoa pela haste e alinhe a ranhura pequena com o bordo do frasco. Parta a zaragatoa dobrando-a para um lado.

Sangue colhido por punção digital: Utilize a zaragatoa (SWAB/E-50) para colher sangue obtido por punção digital e aguarde que absorva 0,1 ml de sangue. Garanta que o sangue cobre pelo menos 2/3 da cabeça da zaragatoa e transfira a amostra inserindo a zaragatoa preparada no frasco de reagente de amostra (consulte a Figura 1). Segure na zaragatoa pela haste e alinhe a ranhura pequena com o bordo do frasco. Parta a zaragatoa dobrando-a para um lado.

Nota Utilize gaze estéril para minimizar o risco de contaminação.

Feche a tampa do frasco de reagente de amostra e misture a amostra num misturador de vórtice durante 10 segundos. Deixe incubar à temperatura ambiente durante 20 minutos.

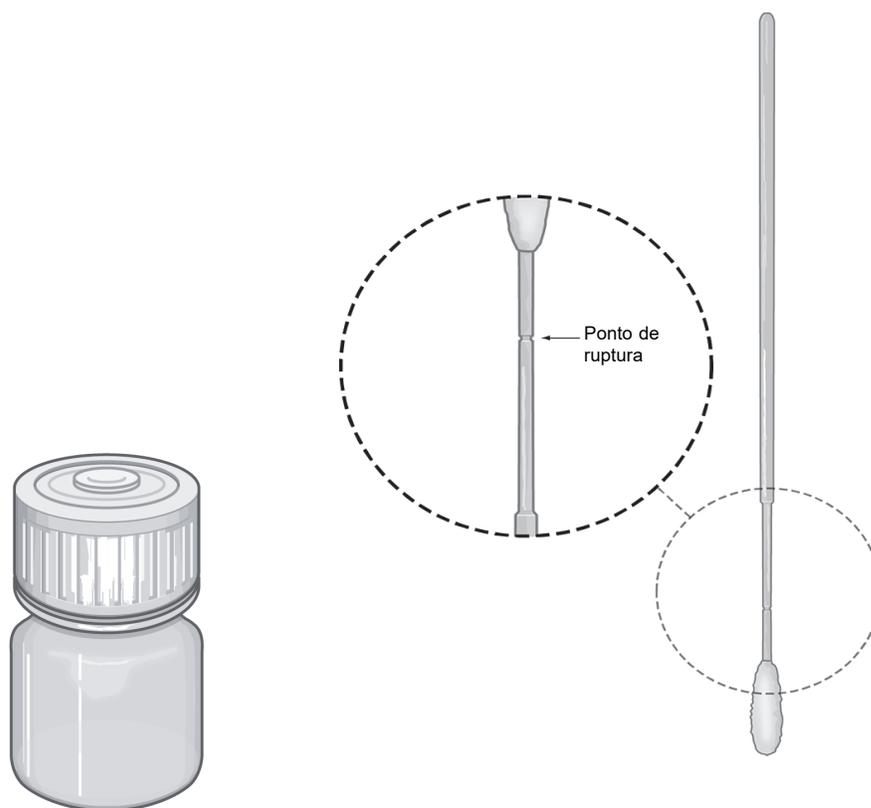


Figura 1. Frasco de reagente de amostra e zaragatoa de colheita de amostra de Ébola do ensaio Xpert Ebola

11.3 Transporte e conservação de amostras

Transporte as amostras tratadas com reagente de amostra para os laboratórios de teste para processamento adicional em embalagens individuais resseláveis de acordo com as orientações da OMS para o transporte de amostras de Ébola: “How to safely collect blood samples from persons suspected to be infected with highly infectious blood-borne pathogens (e.g. Ebola)” (“Como colher seguramente amostras de pessoas com infecção suspeitada por agentes patogénicos altamente infecciosos transmitidos por via sanguínea [por ex., Ébola]”). As amostras de sangue tratadas com reagente de amostra podem ser conservadas durante até 72 horas entre 2 °C e 8 °C, durante até 48 horas a uma temperatura máxima de 28 °C ou durante até 24 horas a uma temperatura máxima de 35 °C. As amostras de zaragatoas bucais tratadas com reagente de amostra podem ser conservadas durante até 72 horas entre 2 °C e 8 °C e durante até 24 horas a uma temperatura máxima de 28 °C.

12 Procedimento

12.1 Preparação do cartucho

Nota Há uma fina película de plástico que cobre o anel interior das portas do cartucho do teste. Esta película não deve ser retirada.

Importante Inicie o teste dentro de 30 minutos após a adição da amostra ao cartucho.

1. Use luvas de protecção descartáveis.
2. Inspeccione o cartucho do teste para verificar se existem danos. Não utilize se estiver danificado.
3. Rotule o cartucho com a identificação da amostra.
4. Abra a tampa do cartucho.
5. Utilize a pipeta de transferência de 1 ml (consulte a Figura 2) ou uma pipeta automática com ponta de barreira com filtro para transferir 1 ml da amostra tratada com reagente de amostra para a câmara da amostra do cartucho (consulte a Figura 3). **NÃO** deite a amostra na câmara da amostra.

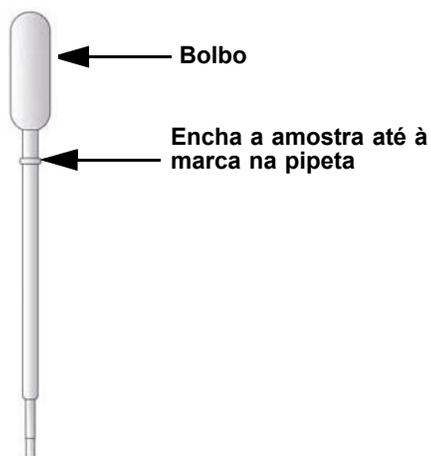


Figura 2. Pipeta de transferência de 1 ml do ensaio Xpert Ebola

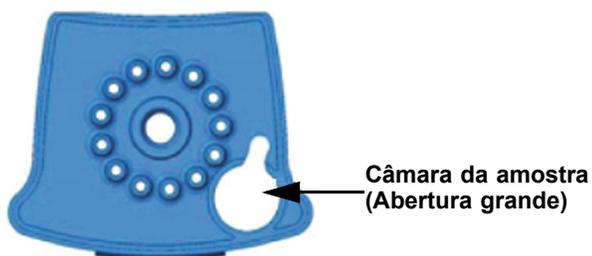


Figura 3. Cartucho do ensaio Xpert Ebola (Vista superior)

12.2 Iniciar o teste

Importante

Antes de iniciar o teste, certifique-se de que o ficheiro de definição do ensaio Xpert Ebola foi importado para o software.

Esta secção discrimina os passos básicos para executar o teste. Para obter instruções detalhadas, consulte o *manual do utilizador do Sistema GeneXpert Dx* ou o *manual do utilizador do Sistema GeneXpert Infinity*, dependendo do modelo que estiver a utilizar.

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 Sistema GeneXpert Dx, clique em **Criar teste** (GeneXpert Dx) ou clique em **Orders** (Encomendas) e em **Order Test** (Encomendar teste) (Infinity).
4. Leia a ID do paciente (opcional). Se digitar a ID do paciente, assegure-se de que digita a ID do paciente correcta. A ID do paciente é associada aos resultados do teste e é mostrada na janela **View Results** (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 **View Results** (Ver resultados) e em todos os relatórios. Aparece a caixa de diálogo **Scan Cartridge** (Ler código de barras do cartucho).
6. Digitalize o código de barras do cartucho do ensaio Xpert Ebola. Aparece a janela **Create Test** (Criar teste). Utilizando a informação do código de barras, o software preenche automaticamente as caixas dos seguintes campos: **Select Assay** (Seleccionar ensaio), **Reagent Lot ID** (ID de lote de reagente), **Cartridge SN** (Número de série do cartucho).
7. Clique em **Iniciar teste** (GeneXpert Dx) ou **Submit** (Enviar) (Infinity). Introduza a sua palavra-passe se lhe for solicitada.
8. Para o Sistema GeneXpert Infinity: coloque o cartucho no tapete rolante. O cartucho será automaticamente carregado, o teste será executado e o cartucho usado será colocado no recipiente para resíduos.

ou

Para o instrumento GeneXpert Dx:

- A. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e carregue o cartucho.
- B. Feche a porta. O teste 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.

13 Visualização e impressão de resultados

Esta secção discrimina as etapas básicas para a visualização e a impressão dos resultados. Para obter instruções mais detalhadas sobre como visualizar e imprimir os resultados, consulte o *manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* ou o *manual do utilizador do sistema GeneXpert Infinity*, dependendo do instrumento utilizado.

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

14 Controlo da qualidade

CONTROL

Cada teste inclui um controlo de adequação da amostra (SAC — **Sample Adequacy Control**), um controlo interno da Cepheid (CIC — Cepheid Internal Control) e um controlo de verificação da sonda (PCC — Probe Check Control).

- **Controlo de adequação da amostra (SAC):** O SAC assegura que foram adicionadas células humanas à câmara da amostra. O SAC é aprovado se cumprir os critérios de aceitação validados.
- **Controlo interno da Cepheid (CIC):** Assegura que a amostra foi correctamente processada. O CIC é um Armored RNA® sob a forma de uma esfera seca que está incluída em cada cartucho para verificar o processamento adequado do vírus da amostra. O CIC verifica se ocorreu a lise do Ébola caso o organismo esteja presente e verifica se o processamento da amostra foi adequado. Adicionalmente, este controlo detecta a inibição da reacção de PCR associada à amostra. O CIC deve ser positivo em amostras negativas e pode ser negativo ou positivo em amostras positivas. O CIC é aprovado se cumprir os critérios de aceitação validados.
- **Controlo de verificação da sonda (PCC, QC1, QC2):** Antes do início do ensaio de transcrição reversa/PCR, o sistema do instrumento GeneXpert mede o sinal de fluorescência de duas das sondas (designadas QC1 e QC2) para monitorizar a reidratação da esfera, o enchimento do tubo de reacção, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. Como a QC1 e a QC2 são medidas na altura da etapa de transcrição reversa/PCR (antes da etapa de PCR em tempo real), não estão disponíveis curvas de crescimento. O PCC é aprovado se cumprir os critérios de aceitação atribuídos.
- **Controlos externos:** Devem ser utilizados controlos externos de acordo com as exigências de organizações de acreditação locais, estaduais e federais, conforme aplicável.
- As amostras negativas de sangue total venoso podem ser utilizadas como controlos negativos externos e executadas como amostras de pacientes.
- Para informações sobre como obter materiais opcionais de controlo externo, contacte a Assistência Técnica através de TechSupport@cepheid.com ou do separador **SUPPORT** (ASSISTÊNCIA) em www.cepheid.com.

15 Interpretação dos resultados

Os resultados são interpretados automaticamente pelo sistema do instrumento GeneXpert com base nos sinais fluorescentes medidos e algoritmos de cálculo integrados, sendo apresentados na janela **View Results** (Ver resultados) (consulte a Figura 4, Figura 5, Figura 6 e Figura 7). Os resultados possíveis são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados e interpretação do ensaio Xpert Ebola

| Resultado | Interpretação |
|--|---|
| <p>Ebola GP DETECTED, Ebola NP DETECTED (GP de Ébola DETECTADO, NP de Ébola DETECTADO) ou Ebola GP DETECTED, Ebola NP NOT DETECTED (GP de Ébola DETECTADO, NP de Ébola NÃO DETECTADO) ou Ebola GP NOT DETECTED, Ebola NP DETECTED (GP de Ébola NÃO DETECTADO, NP de Ébola DETECTADO)</p> <p>Consulte a Figura 4, Figura 5 e Figura 6.</p> | <p>São detectados os alvos de ácidos nucleicos do ÉBOLA.</p> <ul style="list-style-type: none"> • O sinal do ÉBOLA para um dos ou ambos os alvos de ácidos nucleicos tem um limiar de ciclo (Ct — Cycle Threshold) dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) superior à definição mínima. • SAC: NA (não aplicável); o SAC é ignorado devido à ocorrência da amplificação do alvo de ÉBOLA. • CIC: NA (não aplicável); o CIC é ignorado devido à ocorrência da amplificação do alvo de ÉBOLA. • Verificação da sonda: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados. |
| <p>Ebola GP NOT DETECTED, Ebola NP NOT DETECTED (GP de Ébola NÃO DETECTADO, NP de Ébola NÃO DETECTADO)</p> <p>Consulte a Figura 7.</p> | <p>Não são detectados os alvos de ácidos nucleicos do ÉBOLA. O CIC cumpre os critérios de aceitação.</p> <ul style="list-style-type: none"> • SAC: APROVADO; o SAC tem um Ct (limiar de ciclo) dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) superior à definição mínima. • CIC: APROVADO; o CIC tem um Ct (limiar de ciclo) dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) superior à definição mínima. • Verificação da sonda: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados. |

Tabela 1. Resultados e interpretação do ensaio Xpert Ebola (Continuação)

| Resultado | Interpretação |
|----------------------------------|--|
| INVALID (INVÁLIDO) | <p>A presença ou ausência dos alvos de ácidos nucleicos não pode ser determinada. Repita o teste de acordo com as instruções da secção Procedimento de repetição do teste.</p> <ul style="list-style-type: none"> • SAC: FALHOU; o Ct (limiar de ciclo) do SAC não está dentro do intervalo válido e o endpoint (ponto final) é inferior à definição mínima. • CIC: APROVADO; o CIC tem um Ct (limiar de ciclo) dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) superior à definição mínima. • Verificação da sonda: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados. <p>Ou</p> <ul style="list-style-type: none"> • SAC: APROVADO; o SAC tem um Ct (limiar de ciclo) dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) superior à definição mínima. • CIC: FALHOU; o Ct (limiar de ciclo) do CIC não está dentro do intervalo válido e o endpoint (ponto final) é inferior à definição mínima. • Verificação da sonda: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados. |
| ERROR (ERRO) | <p>A presença ou ausência de ácidos nucleicos de ÉBOLA não pode ser determinada. Repita o teste de acordo com as instruções da secção Procedimento de repetição do teste.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ÉBOLA: SEM RESULTADO • SAC: SEM RESULTADO • CIC: SEM RESULTADO • Verificação da sonda: FALHOU; um ou todos os resultados de verificação da sonda falharam. |
| NO RESULT (SEM RESULTADO) | <p>A presença ou ausência dos alvos de ácidos nucleicos de ÉBOLA não pode ser determinada. Repita o teste de acordo com as instruções da secção Procedimento de repetição do teste. NO RESULT (SEM RESULTADO) indica que os dados colhidos foram insuficientes. Por exemplo, o utilizador parou um teste que estava a decorrer.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ÉBOLA: SEM RESULTADO • SAC: SEM RESULTADO • CIC: SEM RESULTADO • Verificação da sonda: NA (não aplicável) |

Nota As capturas de ecrã do ensaio são apenas exemplificativas e poderão variar em relação às apresentadas neste folheto informativo. “QC1” e “QC2” nas legendas da Figura 4, Figura 5, Figura 6 e Figura 7 controlam a presença de sondas (consulte Controlo de verificação da sonda na secção 14, Controlo da qualidade); não são geradas curvas de amplificação.

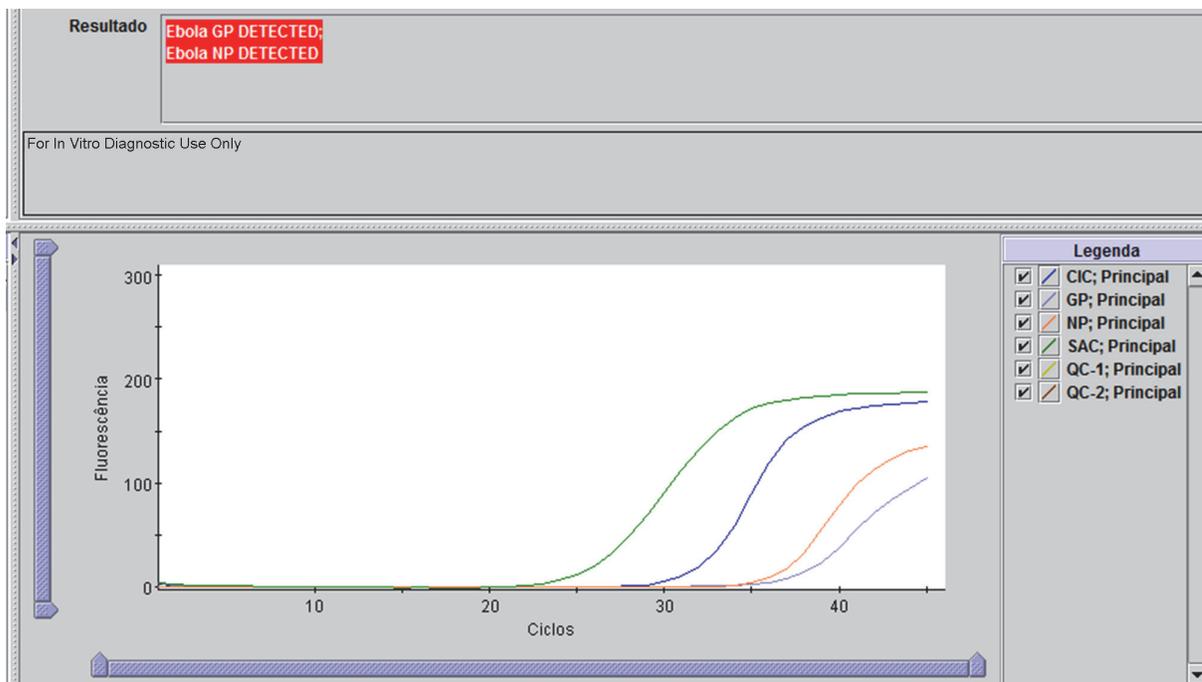


Figura 4. Ebola GP DETECTED, Ebola NP DETECTED (GP de Ébola DETECTADO, NP de Ébola DETECTADO)

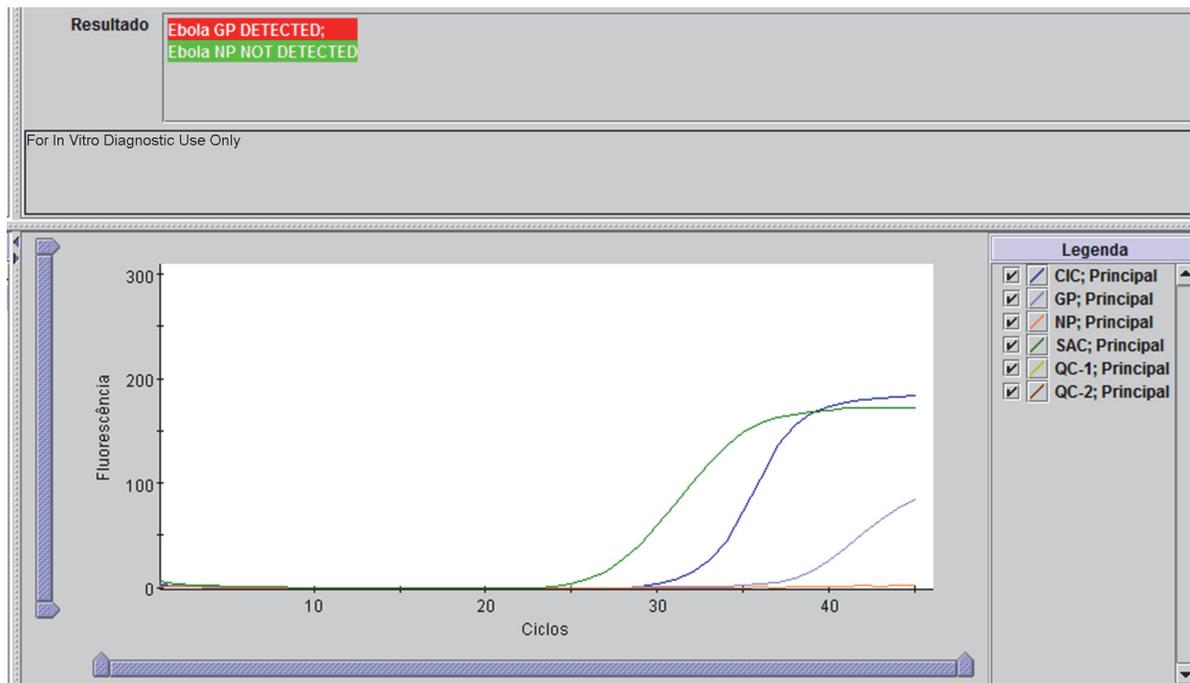
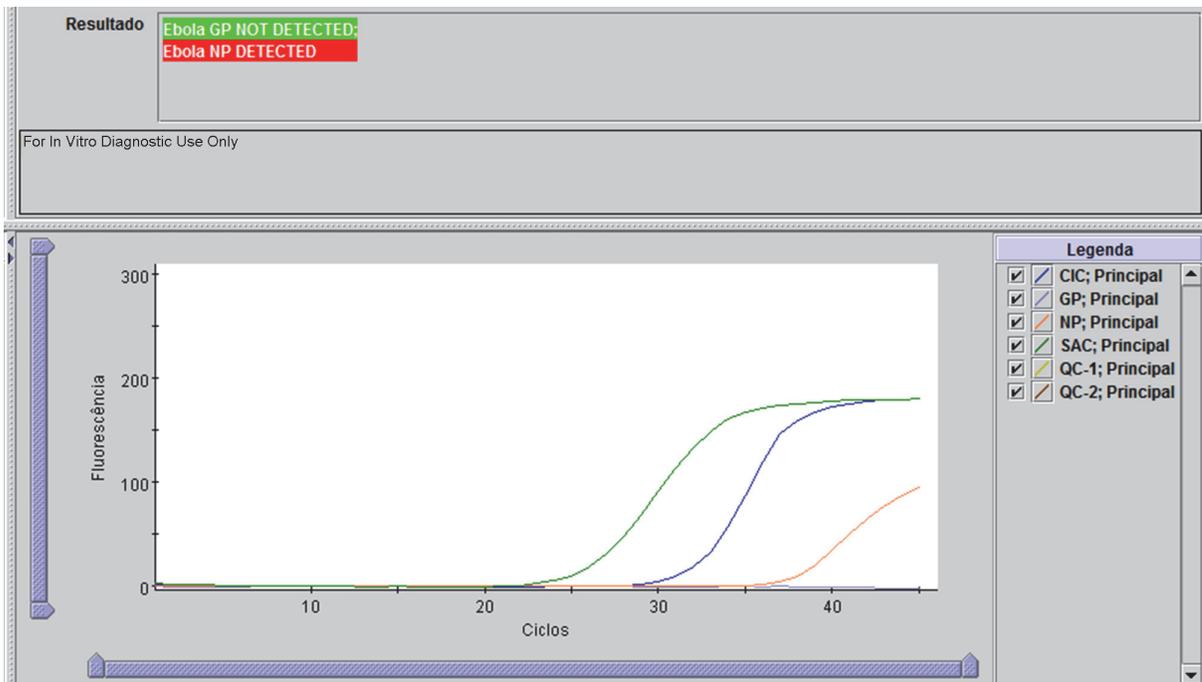
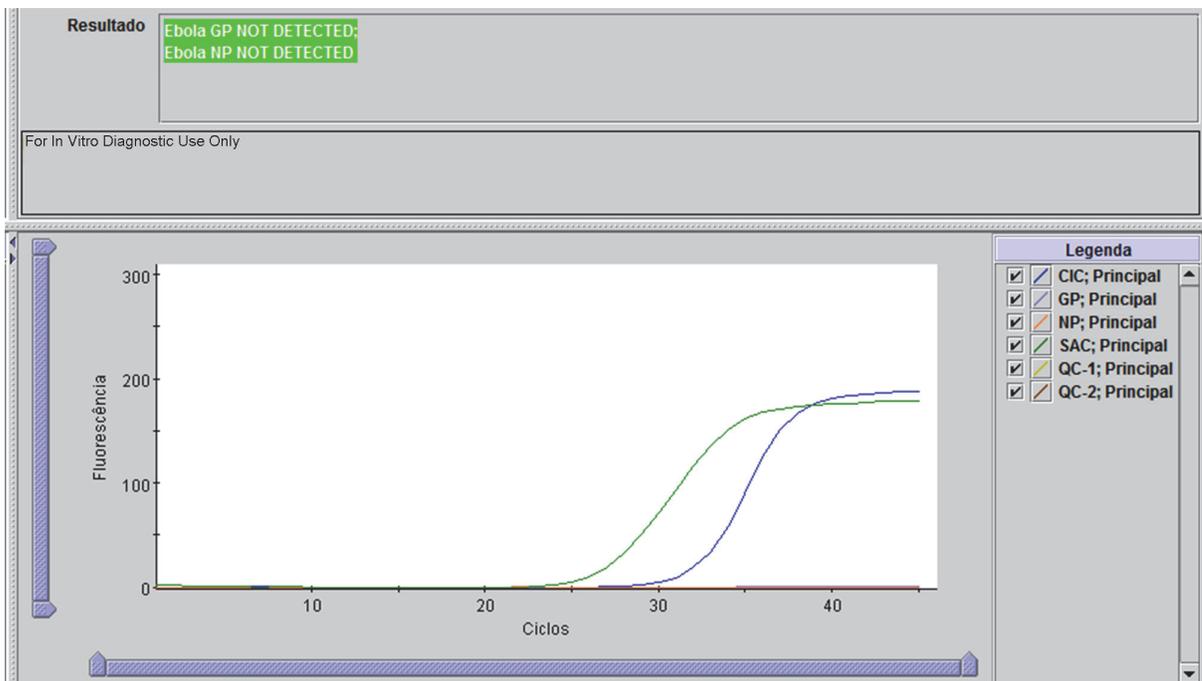


Figura 5. Ebola GP DETECTED, Ebola NP NOT DETECTED (GP de Ébola DETECTADO, NP de Ébola NÃO DETECTADO)



**Figura 6. Ebola GP NOT DETECTED, Ebola NP DETECTED
(GP de Ébola NÃO DETECTADO, NP de Ébola DETECTADO)**



**Figura 7. Ebola GP NOT DETECTED, Ebola NP NOT DETECTED
(GP de Ébola NÃO DETECTADO, NP de Ébola NÃO DETECTADO)**

16 Repetição de um teste

16.1 Motivos para repetir o teste

Se algum dos resultados de teste mencionados abaixo ocorrer, repita o teste de acordo com as instruções da secção 16.2, Procedimento de repetição do teste.

- Um resultado **INVALID** (INVÁLIDO) indica uma ou mais das ocorrências abaixo
 - O controlo CIC falhou.
 - A amostra não foi processada adequadamente ou a PCR foi inibida.
 - O controlo SAC falhou.
 - O volume da amostra adicionada foi insuficiente.
- Um resultado **ERROR** (ERRO) indica que o ensaio foi abortado. Algumas das causas possíveis são: o tubo de reacção não foi adequadamente enchido, foi detectado um problema de integridade da sonda de reagente ou o limite máximo de pressão foi excedido.
- **NO RESULT** (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.

16.2 Procedimento de repetição do teste

Utilize um cartucho novo (não reutilize o cartucho) e reagentes novos para repetir o teste após a obtenção de um resultado **NO RESULT** (SEM RESULTADO), **INVALID** (INVÁLIDO) ou **ERROR** (ERRO).

1. Retire um novo cartucho do kit.
2. Consulte a secção 12.1, Preparação do cartucho e a secção 12.2, Iniciar o teste.

17 Características do desempenho

17.1 Limite de detecção para sangue total

Estimou-se o limite de detecção (LoD — Limit of Detection) do ensaio Xpert Ebola para ARN de Ébola Zaire e para vírus Ébola Zaire vivo. Os testes foram realizados com três painéis de diluição, tendo cada um sido testado utilizando um lote de kit de reagentes. O ARN viral purificado a partir de vírus Ébola Zaire Mayinga obtido da agência de saúde pública da Suécia foi diluído numa mistura de reagente de amostra e sangue total e os vírus Ébola vivos 2014/Gueckedou-C05 e 2014/Gueckedou-C07 foram diluídos em sangue total com EDTA. Testaram-se, no total, 20 réplicas de ARN e 4 réplicas de vírus vivo por nível e amostra. O LoD utilizando ARN foi estimado como a menor concentração de ARN-alvo de Ébola Zaire que podia ser distinguida com reprodutibilidade de amostras negativas com 95% de probabilidade utilizando análise pelo método de Probit. O LoD indicado para ARN de Mayinga foi confirmado analisando pelo menos vinte réplicas diluídas com a concentração estimada para o LoD, utilizando três lotes de reagente do ensaio Xpert Ebola. 95% das réplicas foram positivas para um lote de reagente e 100% para dois lotes de reagente. O LoD estimado para o vírus vivo foi confirmado como a menor concentração de unidade formadora de placas (UFP) por ml de sangue total com EDTA correspondente a pelo menos 19 de 20 réplicas positivas. Os resultados para ARN e vírus vivo de Ébola Zaire são apresentados na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2. Limite de detecção para ARN de Ébola Zaire com o ensaio Xpert Ebola utilizando regressão Probit

| Amostra | Concentração nominal (cópias/ml) | Total de réplicas (N) | Total de positivos (N) | Taxa de positividade (%) | LoD com 95% de probabilidade estimado pelo método de Probit (intervalo de confiança de 95%) |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|---|
| ARN de Ébola Zaire Mayinga | 700 | 20 | 20 | 100 | 232,4 cópias/ml (IC de 95%: 163,1–301,6) |
| | 300 | 20 | 20 | 100 | |
| | 150 | 20 | 13 | 65 | |
| | 75 | 20 | 12 | 60 | |
| | 30 | 20 | 9 | 45 | |
| | 15 | 20 | 5 | 25 | |

Tabela 3. Número de réplicas positivas por nível para vírus Ébola Zaire Makona-Gueckedou 07 e 05 em ST-EDTA e confirmação do limite de detecção

| Amostra | Concentração nominal (UFP/ml) | Total de réplicas (N) | Total de positivos (N) | Taxa de positividade (%) | Confirmação do LoD | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | | | | Concentração nominal (UFP/ml) | Total de réplicas (N) | Total de positivos (N) |
| Vírus Ébola Zaire Makona-Gueckedou 07 | 50 | 4 | 4 | 100 | 1,0 | 20 | 20 |
| | 25 | 4 | 4 | 100 | | | |
| | 12,5 | 4 | 4 | 100 | | | |
| | 1 | 4 | 4 | 100 | | | |
| | 0,1 | 3 | 1 | 33 | | | |
| | 0,01 | 4 | 0 | 0 | | | |
| Vírus Ébola Zaire Makona-Gueckedou 05 | 0,13 | 4 | 4 | 100 | 0,13 | 20 | 20 |
| | 0,065 | 4 | 4 | 100 | | | |
| | 0,0325 | 4 | 3 | 75 | | | |
| | 0,01625 | 4 | 1 | 25 | | | |

17.2 Limite de detecção para zangatoas bucais

Determinou-se o limite de detecção (LoD — Limit of Detection) do ensaio Xpert Ebola para zangatoas bucais com ARN de Ébola Zaire. Um painel de diluição composto por oito membros foi preparado a partir de uma amostra de ARN de Ébola Zaire Mayinga e testado com um lote de reagente. O painel de diluição foi preparado contaminando um grupo de zangatoas em SR com ARN de Ébola, com um intervalo de cerca de 0 a 1000 cópias de ARN de Ébola/zangatoa. O LoD para zangatoas bucais utilizando ARN foi estimado utilizando análise pelo método de Probit. O LoD indicado foi confirmado analisando pelo menos 20 réplicas diluídas com as concentrações estimadas para o LoD, utilizando dois lotes de reagente do ensaio Xpert Ebola. O LoD indicado é definido como a concentração correspondente a 95% de positivos em pelo menos 20 réplicas por lote de reagente (Tabela 4). Determinou-se que o LoD para o ensaio Xpert Ebola utilizando zangatoas bucais contaminadas com ARN de Ébola Zaire Mayinga corresponde a 350,0 cópias/zangatoa.

Tabela 4. Limite de detecção para ARN de Ébola Zaire em amostras bucais com o ensaio Xpert Ebola utilizando regressão Probit e confirmação do limite de detecção

| Amostra | Concentração nominal (cópias/zangatoa) | Total de réplicas (N) | Total de positivos (N) | Taxa de positividade (%) | LoD com 95% de probabilidade pelo método de Probit (intervalo de confiança de 99,9%) | Confirmação do LoD | | | |
|--|--|-----------------------|------------------------|--------------------------|--|--|------------------|-----------------------|------------------------|
| | | | | | | Concentração nominal (cópias/zangatoa) | Lote de reagente | Total de réplicas (N) | Total de positivos (N) |
| ARN de Ébola Zaire em zangatoas bucais | 600 | 20 | 20 | 100 | 250,0 cópias/zangatoa (IC de 99,9%: 149,3-350,0) | 350 | 1 | 20 | 20 |
| | 400 | 20 | 19 | 95 | | | | | |
| | 200 | 20 | 18 | 90 | | | | | |
| | 100 | 20 | 18 | 90 | | | | | |
| | 50 | 20 | 5 | 25 | | | 2 | 20 | 20 |
| | 25 | 20 | 5 | 25 | | | | | |
| | 12,5 | 20 | 1 | 5 | | | | | |
| | 0 | 20 | 0 | 0 | | | | | |

Equivalência de tipos de amostra (sangue total venoso com EDTA e sangue total obtido por punção digital)

Utilizando o ensaio Xpert Ebola e amostras de vinte indivíduos saudáveis, demonstrou-se a equivalência do desempenho para dois tipos de amostra diferentes — sangue total venoso com EDTA e sangue total obtido por punção digital. O sangue obtido por punção venosa foi colhido num tubo com EDTA e transferido para o frasco de reagente de amostra, enquanto o sangue colhido por punção digital foi imediatamente colocado no reagente de amostra. Ambos os tipos de amostra foram contaminados com ARN de Ébola Mayinga a 1500 cópias/ml, efectuando-se uma análise comparativa. Demonstrou-se a equivalência do desempenho entre os tipos de amostra.

Intervalo linear

Determinou-se a linearidade do ensaio Xpert Ebola para os alvos de GP e NP de Ébola analisando-se um painel de seis membros preparado com diluições em série da amostra de ARN de Ébola Mayinga, com um intervalo de 3×10^2 a 1×10^7 cópias/ml de sangue total. Cada membro do painel foi analisado em réplicas de seis utilizando um lote de reagente. Os resultados são apresentados na Figura 8 e Figura 9, demonstrando-se que o ensaio é linear num intervalo de 3×10^2 a 1×10^7 cópias/ml com um valor de R^2 (produto de uma curva padrão) de 0,99 para o alvo de GP de Ébola e de 0,98 para o alvo de NP de Ébola.

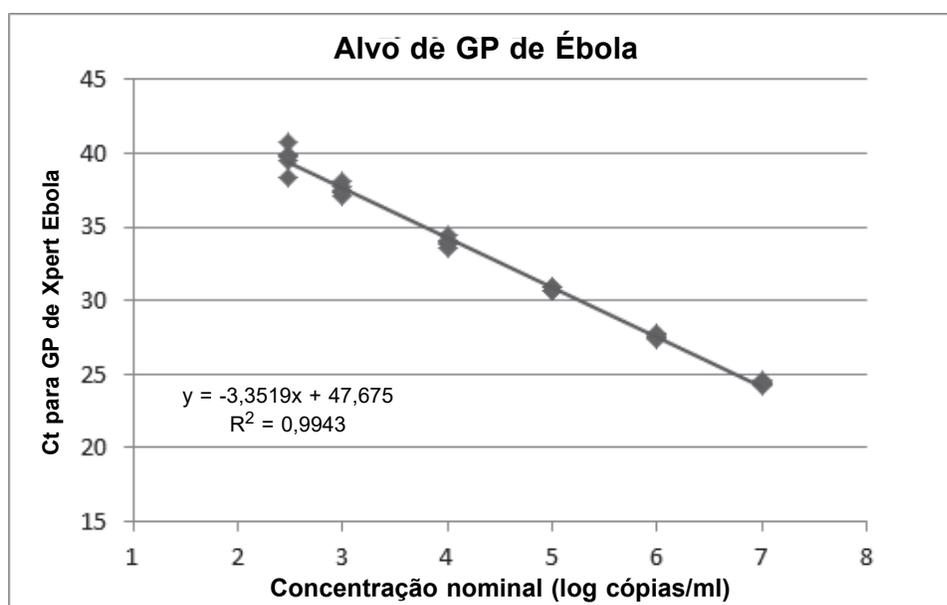


Figura 8. Linearidade do alvo de GP de Xpert Ebola

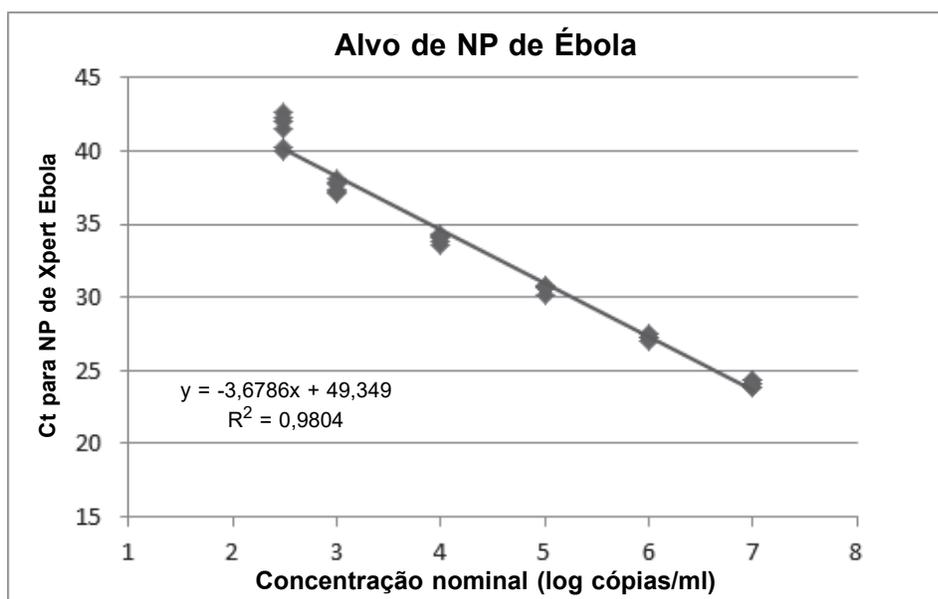


Figura 9. Linearidade do alvo de NP de Xpert Ebola

17.3 Reactividade analítica (Inclusividade)

Determinou-se a reactividade analítica (inclusividade) do Xpert Ebola para quatro estirpes de Ébola Zaire distintas da Mayinga, disponíveis sob a forma de vírus Ébola vivo ou ARN viral. Além disso, realizou-se a análise *in silico* de todas as outras sequências (não testadas) das estirpes de Ébola Zaire disponíveis. As amostras de teste foram preparadas contaminando sangue total com EDTA negativo para Ébola com cada amostra individual ou, no caso da utilização de ARN preparado a partir de vírus, sangue total com EDTA negativo para Ébola misturado com reagente de amostra (SR — Sample Reagent). Cada amostra foi testada em réplicas de 20 e uma amostra de controlo negativo, composta por sangue total com EDTA negativo para Ébola, foi testada em réplicas de três utilizando um lote de reagentes. Os resultados dos testes para amostras positivas para Ébola são apresentados na Tabela 5. Todas as amostras de controlo negativo para Ébola foram indicadas como **Ebola GP NOT DETECTED** (GP de Ébola NÃO DETECTADO), **Ebola NP NOT DETECTED** (NP de Ébola NÃO DETECTADO).

Tabela 5. Reactividade analítica para o ensaio Xpert Ebola

| Estirpe Ébola Zaire | Tipo de amostra | Concentração de teste | Total de réplicas (N) | Total de positivos (N) | Taxa de positividade (%) |
|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Guiné | Vírus vivo | 1 x LoD | 20 | 20 | 100% |
| Ekron | Vírus vivo | 3 x LoD | 20 | 20 | 100% |
| Gabão | Vírus vivo | 3 x LoD | 20 | 20 | 100% |
| Kikwit | ARN | 5 x LoD | 20 | 20 | 100% |

Realizou-se uma análise *in silico* para prever o desempenho do ensaio Xpert Ebola na detecção de todas as sequências de variantes de Ébola Zaire disponíveis no GenBank; desde os dados da primeira sequência Zaire publicados em 1976 até às sequências do actual surto na África Ocidental. As duas sequências de produto da amplificação de Xpert Ebola derivadas de genes de glicoproteína (GP) e nucleoproteína (NP) Zaire foram submetidas ao algoritmo BLAST (NCBI). Além disso, todas as seis sequências de oligonucleótidos de Xpert Ebola foram verificadas individualmente numa base de dados de alinhamento local contendo todas as sequências de Ébola Zaire disponíveis no GenBank. As análises mostraram que os oligonucleótidos de NP e GP de Ébola Zaire correspondem completamente a todas as sequências Zaire existentes no GenBank.

17.4 Especificidade analítica (exclusividade)

Avaliou-se a especificidade analítica do ensaio Xpert Ebola testando-se vírus e bactérias não Ébola e estirpes de Ébola não Zaire aos níveis clinicamente relevantes. As amostras foram preparadas contaminando sangue total com EDTA negativo para Ébola com cada organismo individual ou, no caso da utilização de ARN/ADN genómico do organismo, sangue total com EDTA negativo para Ébola misturado com reagente de amostra. Os resultados de especificidade analítica são apresentados na Tabela 6 e Tabela 7. A especificidade analítica do ensaio Xpert Ebola para os organismos avaliados foi de 100%.

Tabela 6. Determinação da especificidade analítica do ensaio Xpert Ebola, amostras positivas para Ébola não Zaire

| Organismo | Tipo de amostra | Conc. de teste (conc. das partículas utilizadas para isolamento de ácidos nucleicos) | Unidade (ng ou UFP/ml de ST) | N | Resultados positivos | Resultados negativos |
|-----------------------|------------------|--|------------------------------|---|----------------------|----------------------|
| Ébola Costa do Marfim | Ácidos nucleicos | 546 ^a | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| Ébola Reston | Ácidos nucleicos | 3,0 x 10 ⁵ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |

a. Concentração de ARN no material de referência

Tabela 7. Determinação da especificidade analítica do ensaio Xpert Ebola, amostras não Ébola

| Organismo | Tipo de amostra | Conc. de teste (conc. das partículas utilizadas para isolamento de ácidos nucleicos) | Unidade (ng ou UFP/ml de ST) | N | Resultados positivos | Resultados negativos |
|---|------------------|--|------------------------------|---|----------------------|----------------------|
| Vírus Chikungunya (181/25) | Ácidos nucleicos | 2798 ^a | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Coxiella burnetti</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| Vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo (Dubai) | Ácidos nucleicos | 3,4 x 10 ⁶ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| Vírus Dengue (Tipo 2) | Ácidos nucleicos | 2,7 x 10 ⁶ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| Vírus da gripe A (H9N2) | Ácidos nucleicos | 1,0 x 10 ⁵ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| Vírus de Lassa (Pinneo) | Ácidos nucleicos | 5,7 x 10 ³ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| Marburgo (Angola) | Ácidos nucleicos | 2,6 x 10 ⁶ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| Marburgo (Angola) | Vírus vivo | 5,0 x 10 ^{4b} | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| Marburgo (Musoke) | Ácidos nucleicos | 6,0 x 10 ⁴ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| Marburgo (Musoke) | Vírus vivo | 5,0 x 10 ^{4b} | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| Marburgo (Ravn) | Ácidos nucleicos | 4,8 x 10 ⁵ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| Mosquito | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Rickettsia conorii</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Rickettsia prowazekii</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Rickettsia typhi</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| Vírus da febre do vale do Rift (SA51) | Ácidos nucleicos | 7,5 x 10 ⁵ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |

Tabela 7. Determinação da especificidade analítica do ensaio Xpert Ebola, amostras não Ébola (Continuação)

| Organismo | Tipo de amostra | Conc. de teste (conc. das partículas utilizadas para isolamento de ácidos nucleicos) | Unidade (ng ou UFP/ml de ST) | N | Resultados positivos | Resultados negativos |
|---------------------------------|------------------|--|------------------------------|---|----------------------|----------------------|
| <i>Salmonella bongori</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Salmonella typhi</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Shigella flexneri</i> Tipo 2 | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| Carraça | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| Febre-amarela (OBS-6745) | Ácidos nucleicos | 1,0 x 10 ⁶ | UFP/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |
| <i>Yersinia pestis</i> | Ácidos nucleicos | 50 | ng/ml | 3 | 0 | 3 |

- a. Concentração de ARN no material de referência
b. Concentração de teste do vírus vivo.

Foram realizadas análises *in silico* para prever o risco de reactividade cruzada dos oligonucleótidos-alvo (GP e NP) de Zaire do ensaio Xpert Ebola com vírus de Ébola não Zaire, bem como com todos os agentes patogénicos de doença de exclusividade indicados na Tabela 7 e Tabela 8. As análises mostram que as sequências do iniciador e da sonda do Xpert Ebola são específicas e não deverão originar resultados de Ébola Zaire falsos positivos com os organismos avaliados.

Tabela 8. Especificidade analítica com organismos em análise *in silico*

| Organismo |
|-------------------------------|
| Ébola Sudão-Boniface |
| Ébola Sudão-Bundibugyo |
| Ébola Sudão-Gulu |
| Adenovírus |
| <i>Borrelia recurrentis</i> |
| Enterovírus |
| Vírus da gripe B |
| Género <i>Leptospira</i> |
| Marburgo (Ci67) |
| <i>Neisseria meningitidis</i> |
| <i>Plasmodium falciparum</i> |
| <i>Plasmodium malariae</i> |
| <i>Plasmodium ovale</i> |
| <i>Plasmodium vivax</i> |
| <i>Rickettsia africae</i> |
| Rotavírus |
| Vírus respiratório sincicial |
| <i>Trypanosoma</i> |
| <i>Vibrio cholerae</i> |

17.5 Substâncias que podem interferir

Avaliou-se a susceptibilidade do ensaio Xpert Ebola a interferência de níveis elevados de substâncias endógenas existentes no sangue total. Para as substâncias endógenas, testou-se sangue total com EDTA negativo para Ébola e sangue total com EDTA positivo para Ébola contaminado com as substâncias. Para preparar as amostras positivas para Ébola, adicionou-se ARN de Ébola Zaire Mayinga (2500 cópias/ml) ao reagente de amostra, sendo depois misturado com sangue total com EDTA contaminado individualmente com cada substância interferente. Avaliaram-se cinco substâncias, no total, com as concentrações indicadas na Tabela 9. Foram testadas seis réplicas de cada amostra utilizando um lote de kit de reagentes. Demonstrou-se que níveis elevados das substâncias endógenas indicadas na Tabela 9 não afectaram a especificidade do ensaio nem interferiram na detecção de Ébola.

Tabela 9. Substâncias endógenas e concentração testadas

| Substâncias endógenas | Concentração testada |
|-----------------------|----------------------|
| Albumina | 90,0 mg/ml |
| Bilirrubina | 0,300 mg/ml |
| ADN humano | 4,0 µg/ml |
| Hemoglobina | 5,0 mg/ml |
| Triglicéridos | 30,0 mg/ml |

17.6 Testes com amostras clínicas artificiais

Avaliaram-se as características do desempenho do ensaio Xpert Ebola utilizando amostras clínicas artificiais. Os dados indicados a partir destas amostras clínicas artificiais foram obtidos através de estratégias de ocultação. Como é difícil obter amostras clínicas de pacientes infectados por Ébola, as amostras artificiais foram preparadas contaminando amostras de sangue total (ST) com EDTA obtidas de diferentes indivíduos negativos para Ébola com vírus Ébola vivo ou ARN viral de Ébola. O ST foi contaminado com vírus Ébola ou ARN viral de Ébola com concentrações variáveis, desde níveis próximos do LoD até níveis elevados (até 200x superior ao limite de detecção [LoD]). Além disso, também se testaram amostras de ST-EDTA não contaminadas de diferentes dadores individuais negativos. Foi utilizada ocultação ao testar as amostras com o ensaio Xpert Ebola.

A concordância positiva percentual (PPA — Positive Percent Agreement) para ARN de vírus Ébola Mayinga foi de 100,0% (50/50, [IC de 95%: 92,9–100,0]), para vírus vivo Ébola Makona-Gueckedou 05 foi de 100,0% (50/50, [IC de 95%: 92,9–100,0]) e para vírus vivo Ébola Makona-Gueckedou 07 foi de 84,0% (42/50, [IC de 95%: 71,5–97,1]). A concordância negativa percentual foi de 100,0% (50/50 [IC de 97,5%: 92,9–100,0]) para cada estudo. A Tabela 10, Tabela 11 e Tabela 12 mostram os resultados tanto para as amostras negativas como para as amostras contaminadas com Ébola.

Tabela 10. Número de resultados de teste positivos e negativos para amostras contaminadas com ARN de Ébola Zaire Mayinga e amostras de controlo negativo

| Concentração nominal | N | Resultados positivos | | Resultados negativos |
|---|----|----------------------|------|----------------------|
| 0 | 50 | 0 | | 50 |
| 1 x LoD | 25 | 25 | | 0 |
| 3 x LoD | 10 | 10 | | 0 |
| 10 x LoD | 10 | 10 | | 0 |
| 100 x LoD | 5 | 5 | | 0 |
| | | | | IC de 95% |
| Concordância positiva percentual | | 50/50 | 100% | 92,9%-100% |
| Concordância negativa percentual | | 50/50 | 100% | 92,9%-100% |

Tabela 11. Número de resultados de teste positivos e negativos para amostras contaminadas com vírus Ébola Makona-Gueckedou 05 e amostras de controlo negativo

| Concentração nominal | N | Resultados positivos | | Resultados negativos |
|---|----|----------------------|------|----------------------|
| 0 | 50 | 0 | | 50 |
| 1 x LoD | 25 | 25 | | 0 |
| 3 x LoD | 10 | 10 | | 0 |
| 10 x LoD | 10 | 10 | | 0 |
| 100 x LoD | 5 | 5 | | 0 |
| | | | | IC de 95% |
| Concordância positiva percentual | | 50/50 | 100% | 92,9%-100% |
| Concordância negativa percentual | | 50/50 | 100% | 92,9%-100% |

Tabela 12. Número de resultados de teste positivos e negativos para amostras contaminadas com vírus Ébola Makona-Gueckedou 07 e amostras de controlo negativo

| Concentração nominal | N | Resultados positivos | | Resultados negativos |
|---|----|----------------------|-------|----------------------|
| 0 | 50 | 0 | | 50 |
| 2 x LoD | 25 | 21 | | 4 |
| 6 x LoD | 10 | 10 | | 0 |
| 20 x LoD | 10 | 6 | | 4 |
| 200 x LoD | 5 | 5 | | 0 |
| | | | | IC de 95% |
| Concordância positiva percentual | | 42/50 | 84,0% | 71,5%-97,1% |
| Concordância negativa percentual | | 50/50 | 100% | 92,9%-100% |

Uma investigação das diferenças nos resultados de PPA para as amostras artificiais contaminadas com vírus Ebola Makona-Gueckedou 07 (Tabela 12), quando comparados com os outros dois conjuntos de amostras artificiais (Tabela 10 e Tabela 11), revelou inconsistências na preparação das amostras. As zaragoatas não foram completamente submergidas nas amostras contendo sangue total contaminado com Ébola Makona-Gueckedou 07, limitando a quantidade de amostra disponível para o teste. Repetiu-se o teste para as amostras artificiais contaminadas com vírus Ébola Makona-Gueckedou 07 utilizando 50 amostras individuais de ST com as concentrações finais e o volume correctos para cada amostra. A Tabela 13 mostra um resumo dos resultados para cada concentração testada e a concordância positiva e negativa percentual para a repetição do estudo.

Tabela 13. Resumo dos resultados e concordância positiva e negativa percentual para as amostras clínicas artificiais contaminadas com vírus Ébola Makona-Gueckedou 07 — Texas

| Concentração nominal | N | Resultados positivos | | Resultados negativos |
|---|----|----------------------|-------|----------------------|
| 0 | 6 | 0 | | 6 |
| 1 x LoD | 25 | 20 | | 5 |
| 3 x LoD | 10 | 10 | | 0 |
| 10 x LoD | 10 | 10 | | 0 |
| 100 x LoD | 5 | 5 | | 0 |
| | | | | IC de 95% |
| Concordância positiva percentual | | 45/50 | 90,0% | 78,6%-95,7% |
| Concordância negativa percentual | | 6/6 | 100% | 61,0%-100% |

18 Eficácia virucida

Avaliou-se a eficácia do reagente de amostra (SR — Sample Reagent) Xpert Ebola na inativação do vírus Ébola (EBOV) após 20 minutos de incubação em SR adicionando $4,6 \times 10^6$ UFP de vírus Ébola Zaire Guiné vivo a 2,5 ml de SR. Depois da inativação, a mistura EBOV/SR foi submetida a diálise utilizando um dispositivo de diálise de equilíbrio rápido de utilização única. O controlo utilizado para a experiência de inativação foi vírus Ébola Zaire Kikwit vivo ($\sim 1 \times 10^7$ UFP/ml) diluído 10 vezes em tampão de lise AVL completo e inativado durante 5 minutos a 90 °C. O vírus Zaire Guiné vivo ($4,6 \times 10^6$ UFP) foi utilizado como controlo positivo. Estudou-se a eficiência virucida do SR adicionando a mistura vírus/SR a células Vero E6 confluentes e monitorizando o efeito citopático (CPE — Cytopathic Effect) em duas passagens (7 + 7 dias) em réplicas de três. O SR Xpert Ebola inativou completamente o vírus EBOV adicionado, demonstrando ser 100% eficaz para até 6 log de EBOV.

19 Limitações do ensaio

- Os resultados de teste negativos não excluem a infecção por vírus Ébola e não devem ser utilizados como base única para o tratamento ou outras decisões sobre o atendimento dos pacientes.
- Todos os resultados de teste devem ser interpretados por um profissional com formação, juntamente com uma análise do historial e dos sinais e sintomas clínicos do paciente.
- Este teste foi avaliado apenas para utilização com sangue total humano e amostras de zaragatoa bucal.
- As amostras de pacientes a quem tenham sido administradas terapêuticas ou vacinas com base em sequências de ácidos nucleicos derivadas do vírus Ébola Zaire poderão apresentar resultados de teste falsos positivos ou outros resultados que suscitem perplexidade.
- Este teste é um teste qualitativo e não fornece um valor quantitativo para o vírus existente na amostra.
- A interpretação de resultados do ensaio Xpert Ebola tem de considerar a possibilidade de resultados falsos positivos e falsos negativos.
- Os resultados falsos positivos podem ser provocados por contaminação cruzada pelo organismo-alvo, pelos respectivos ácidos nucleicos ou pelo produto da amplificação de PCR.
- Caso não se sigam os procedimentos do ensaio, poderão obter-se resultados falsos.
- Os inibidores presentes nas amostras podem provocar resultados falsos negativos.
- Podem ocorrer resultados erróneos devido a incorrecções na recolha, no manuseamento ou no armazenamento da amostra, troca de amostras ou por o número de organismos na amostra ser demasiado baixo para detecção pelo teste. É necessário cumprir cuidadosamente as instruções deste folheto informativo para evitar resultados erróneos.
- Mutações ou polimorfismos nas regiões de ligação do iniciador (primer) ou da sonda podem afectar a detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem originar um resultado falso negativo.

20 Referências

1. WHO Ebola Situation Reports <http://apps.who.int/ebola/en/ebola-situation-reports>.
2. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on the classification labeling and packaging of substances and mixtures amending and repealing, List of Precautionary Statements, Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC (amending Regulation (EC)).
3. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z)

21 Locais das sedes da Cepheid

Sede corporativa

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

Sede europeia

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

22 Assistência Técnica

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

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

Informações de Contato

EUA
Telefone: + 1 888 838 3222
Email: techsupport@cepheid.com

França
Telefone: + 33 563 825 319
Email: support@cepheideurope.com

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

Termos e Condições da Cepheid podem ser encontrados em <http://www.cepheid.com/en/support/support-solutions/customer-order-administration>.

23 Tabela de símbolos

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



Cepheid
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Sweden



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



