

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

PATRÍCIA ESTRELA EVANGELISTA

**VALIDAÇÃO DE SISTEMA SINDRÔMICO MULTIPLEX PARA DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DE MENINGITES BACTERIANAS**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2021**

PATRÍCIA ESTRELA EVANGELISTA

**VALIDAÇÃO DE SISTEMA SINDRÔMICO MULTIPLEX PARA DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DE MENINGITES BACTERIANAS**

**Validation of a multiplex syndromic system for the molecular diagnostic of
bacterial meningitis**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de “Mestre em Ciências” – Área de
Concentração Engenharia Biomédica, da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Dr. João Antônio Palma Setti

**CURITIBA
2021**



PATRICIA SALLES ESTRELA EVANGELISTA

**VALIDAÇÃO DE SISTEMA SINDRÔMICO MULTIPLEX PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
MENINGITES BACTERIANAS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Data de aprovação: 10 de Junho de 2021

Prof Joao Antonio Palma Setti, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Gustavo Henrique Couto, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Siliane Denise Berte, Doutorado - Mobius Lifescience

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 10/06/2021.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. João A. P. Setti, pelo auxílio, disponibilidade e competência na orientação e condução do trabalho durante todo o processo.

Ao meu noivo, Paulo Henrique G. Tenório, que me incentivou a realizar o mestrado e acompanhou minha trajetória desde o início até sua síntese.

A empresa Mobius Life Science e equipe de desenvolvimento de produtos pelo apoio e doação do material para realização dos estudos.

RESUMO

Estima-se que haja anualmente mais de 1,2 milhões de casos de meningite bacteriana em todo o mundo, com coeficientes de incidência e letalidade que variam de acordo com a região, país, faixa etária e agente etiológico. No Brasil, o número de casos referentes às meningites de origem bacteriana é preocupante, pois além de sua rápida evolução e letalidade, representam em número de casos o segundo maior número de registros, com uma representatividade de 27,4%, de acordo com os dados de vigilância epidemiológica. Assim, considerando que a identificação etiológica e o diagnóstico precoce são essenciais para a definição de tratamentos antimicrobianos adequados, instituição de medidas de controle e até mesmo para o monitoramento do perfil epidemiológico da doença, e que, durante a pesquisa bibliográfica, foi identificado a existência de uma quantidade ordinária de plataformas totalmente automatizadas disponíveis no mercado, em conjunto com uma ausência de compatibilidade entre plataformas e painéis moleculares multiplex. O presente trabalho teve como objetivo validar o painel molecular multiplex XGEN MULTI MB (Fab.: Mobius LifeScience, Ref. XG-MB-MB-24) para uso em conjunto com a plataforma totalmente automatizada BD MAX™ System (Fab.: BD Diagnostics, Ref. BD MAX™ System), formando assim um sistema sindrômico multiplex utilizado para diagnóstico molecular de meningites bacterianas, denominado ao longo do trabalho como SSM MB. Como layout de validação, foram consideradas seis etapas de ensaios analíticos, compostas por ensaios de robustez, sensibilidade analítica, especificidade analítica, precisão e exatidão/acurácia, somando um total de 162 testes realizados. Para realização dos ensaios, foram utilizadas amostras previamente conhecidas como negativas para os patógenos em análise, em conjunto com padrões sintéticos de concentração conhecida, específicos para detecção dos alvos detectados no painel molecular multiplex XGEN MULTI MB. Após a avaliação dos resultados obtidos verificou-se que o sistema sindrômico multiplex SSM MB apresentou: curvas de amplificação em formato exponencial, resultados de detecção válidos e valores de fluorescência de acordo com o padrão observado na rotina utilizando um ganho de 80 (ensaios de robustez); capacidade de detectar os patógenos *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* até uma concentração mínima de aproximadamente 13 cópias/μL (ensaios de sensibilidade analítica); capacidade de realizar detecções apenas do patógeno alvo, em canal específico, sem indícios de interferência de fluorescência em outros canais ópticos (ensaios de especificidade analítica); capacidade de detectar medições sucessivas de um mesmo analito, em condições operacionais inalteradas e em condições operacionais distintas, com resultados concordantes e dentro dos critérios de aceite proposto (ensaios de precisão); capacidade de detectar valores de medição próximos aos resultados aceitos como verdadeiramente corretos (ensaios de exatidão/acurácia). Deste modo, concluiu-se que o sistema sindrômico multiplex SSM MB atendeu aos objetivos previamente propostos, com resultados considerados como satisfatórios em todas as etapas de ensaio realizadas. Tanto que, posteriormente, os dados gerados neste trabalho também serão utilizados como base pelo fabricante, para atualização de registro do produto e inclusão da plataforma BD MAX™ System (Fab.: BD Diagnostics, Ref. BD MAX™ System) como equipamento compatível com o kit, perante o órgão regulamentador (ANVISA).

Palavras-chave: Automação. Meningite bacteriana. PCR multiplex. Painéis
sindrômicos. Diagnóstico molecular.

ABSTRACT

It is estimated that annually there are more than 1.2 million cases of bacterial meningitis worldwide, with coefficients of incidence and lethality that vary according to region, country, age group and etiologic agent. In Brazil, the number of cases referring to bacterial meningitis is worrying, because besides its rapid evolution and lethality, it represents, in number of cases, the second largest number of records, with a representativeness of 27.4% according to the epidemiological surveillance data. Also, considering that the etiological identification and early diagnosis are essential for the definition of appropriate antimicrobial treatments, institution of control measures and monitoring of the disease's epidemiological profile, along with the fact that during the bibliographic search an ordinary amount of fully automated platforms available on the market were found and a lack of compatibility between platforms and multiplex molecular panels was identified. The present study aimed to validate the multiplex molecular panel XGEN MULTI MB (Fab.: Mobius LifeScience, Ref. XG-MB-MB-24) for the use with a fully automated platform BD MAX™ System (Fab.: BD Diagnostics, Ref. BD MAX™ System), forming together a multiplex syndromic system used for the molecular diagnosis of bacterial meningitis, later described as SSM MB. As validation layout, six stages of analytical tests were considered, including tests of robustness, analytical sensitivity, analytical specificity, precision, and accuracy, summing a total of 162 tests performed. For the testing procedure, previously known negative samples for the pathogens under analysis were used, along with synthetic standards of known concentration specific for the targets' detection of the multiplex molecular panel XGEN MULTI MB. After the result's evaluation, it was verified that the SSM MB multiplex syndromic system presented: amplification curves on exponential format, valid detection results and fluorescence values according to the pattern observed in the routine when using a gain of 80 (robustness tests); ability to detect *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* at a minimum concentration of approximately 13 copies/μL (analytical sensitivity tests); ability to perform detections only from the target pathogen, on specific channels and without evidence of fluorescence interference on another optical channels (analytical specificity tests); ability to detect successive measurements of the same analyte, under unaltered operating conditions and under different operating conditions, with consistent results and within the proposed acceptance criteria (precision tests); ability to detect measurement values, close to results accepted as truly correct (accuracy tests). Therefore, it was concluded that the SSM MB multiplex syndromic system met the objectives previously proposed with results considered satisfactory in all the tests performed. Such as that later, the data generated on this study will also be used by the manufacturer to update the product registration, adding the BD MAX™ System platform (Fab.: BD Diagnostics, Ref. BD MAX™ System) as an equipment compatible with the kit, at the correspondent regulatory authorities (ANVISA).

Keywords: Automation. Bacterial meningitis. Molecular diagnostics. Multiplex PCR. Syndromic panels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plataforma totalmente automatizada BD MAX™ System	44
Figura 2 - Cabeçote de manuseio de líquidos + Tira de reagentes	45
Figura 3 – Cartucho de PCR BD MAX™	45
Figura 4 – Canais de fluorescência disponíveis no BD MAX™ System	46
Figura 5 – Composição Kit XGEN MULTI MB	47
Figura 6 – Seleção de detectores Kit XGEN MULTI MB	48
Figura 7 – Validação da Corrida.....	48
Figura 8 – Análise das Amostra Clínicas.....	48
Figura 9 – Etapas de Testes	49
Figura 10 – Tubo SBT + Posições da Tira Unitizada.....	54
Figura 11 – Etapas Automatizadas plataforma BD MAX™ System	55
Figura 12 – Patógenos – Ganho 60 – Etapa 1	56
Figura 13 – Patógenos – Ganho 80 – Etapa 1	57
Figura 14 – Resultados Ensaio de Robustez – Etapa 1	58
Figura 15 – Patógenos – Ganho 80 – Etapa 2	61
Figura 16 – Ensaio de Sensibilidade – P1 – <i>Neisseria meningitidis</i>	66
Figura 17 – Ensaio de Sensibilidade – P2 – <i>Neisseria meningitidis</i>	66
Figura 18 – Ensaio de Sensibilidade – P3 – <i>Neisseria meningitidis</i>	66
Figura 19 – Ensaio de Sensibilidade – P4 – <i>Neisseria meningitidis</i>	67
Figura 20 – Ensaio de Sensibilidade – P5 – <i>Neisseria meningitidis</i>	67
Figura 21 – Ensaio de Sensibilidade – P6 – <i>Neisseria meningitidis</i>	68
Figura 22 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Valores de Ct – <i>Neisseria meningitidis</i>	69
Figura 23 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Intensidade de Fluorescência – <i>Neisseria meningitidis</i>	69
Figura 24 – Ensaio de Sensibilidade – P1 – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	73
Figura 25 – Ensaio de Sensibilidade – P2 – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	73
Figura 26 – Ensaio de Sensibilidade – P3 – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	73
Figura 27 – Ensaio de Sensibilidade – P4 – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	74
Figura 28 – Ensaio de Sensibilidade – P5 – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	74
Figura 29 – Ensaio de Sensibilidade – P6 – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	74
Figura 30 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Valores de Ct – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	75
Figura 31 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Intensidade de Fluorescência – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	76
Figura 32 – Ensaio de Sensibilidade – P1 – <i>Haemophilus influenzae</i>	79
Figura 33 – Ensaio de Sensibilidade – P2 – <i>Haemophilus influenzae</i>	80
Figura 34 – Ensaio de Sensibilidade – P3 – <i>Haemophilus influenzae</i>	80
Figura 35 – Ensaio de Sensibilidade – P4 – <i>Haemophilus influenzae</i>	80
Figura 36 – Ensaio de Sensibilidade – P5 – <i>Haemophilus influenzae</i>	81
Figura 37 – Ensaio de Sensibilidade – P6 – <i>Haemophilus influenzae</i>	81
Figura 38 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Valores de Ct – <i>Haemophilus influenzae</i>	82
Figura 39 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Intensidade de Fluorescência – <i>Haemophilus influenzae</i>	82
Figura 40 – Ensaio de Especificidade – <i>Neisseria meningitidis</i> – Ensaio #1	86

Figura 41 – Ensaios de Especificidade – <i>Neisseria meningitidis</i> – Ensaio #2	87
Figura 42 – Ensaios de Especificidade – <i>Neisseria meningitidis</i> – Ensaio #3	88
Figura 43 – Ensaios de Especificidade – <i>Streptococcus pneumoniae</i> – Ensaio #1 ..	90
Figura 44 – Resultados Ensaios de Repetibilidade – <i>Neisseria meningitidis</i>	96
Figura 45 – Resultados Ensaios de Repetibilidade – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	97
Figura 46 – Resultados Ensaios de Repetibilidade – <i>Haemophilus influenzae</i>	97
Figura 47 – Resultados Ensaios de Reprodutibilidade	100
Figura 48 – Resultados Ensaios de Exatidão - <i>Neisseria meningitidis</i>	103
Figura 49 – Resultados Ensaios de Exatidão - <i>Neisseria meningitidis</i>	104
Figura 50 – Resultados Ensaios de Exatidão - <i>Neisseria meningitidis</i>	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Técnicas convencionais para diagnóstico de meningites bacterianas	23
Quadro 2 – Plataformas totalmente automatizadas utilizadas no diagnóstico de meningites bacterianas registradas na ANVISA.....	29
Quadro 3 - Painéis Moleculares Multiplex para detecção de meningites bacterianas registrados na ANVISA.....	30
Quadro 4 – Termos e definições utilizados para ensaios de <i>performance</i> para uso IVD.	39
Quadro 5 – Ensaio de performance recomendados para validação de testes <i>in-house</i> /produtos por autor	42
Quadro 6 – Quantitativo de amostras recomendados para validação de testes <i>in-house</i> /produtos IVD alterados	43
Quadro 7 – Plano de validação do Sistema Síndromico Multiplex SSM MB.	50
Quadro 8 – Padrões Sintéticos.....	51
Quadro 9 - Protocolo de PCR personalizado para XGEN MULTI MB na plataforma BD MAX™ System	52
Quadro 10 – Ilustração da janela “color compensation” após definição da configuração padrão para o SSM MB	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de Ct e fluorescência - Ganho 60 - Etapa 1	55
Tabela 2 - Valores de Ct e fluorescência - Ganho 80 - Etapa 1	57
Tabela 3 - Cálculos de Diluição Inicial e Concentração dos Padrões Sintéticos	60
Tabela 4 – Cálculos de Concentração Esperada Alvos Ensaio #1 – Etapa 2	61
Tabela 5 - Valores de Ct e fluorescência - Ganho 80 - Etapa 2	61
Tabela 6 - Cálculo dos Pontos de Diluição Padrão para <i>Neisseria meningitidis</i>	63
Tabela 7 – Cálculos de Concentração Esperada - Pontos de Diluição Padrão <i>Neisseria meningitidis</i>	64
Tabela 8 - Valores de Ct e fluorescência – Ensaio de Sensibilidade Analítica – <i>Neisseria Meningitidis</i>	65
Tabela 9 - Cálculo dos Pontos de Diluição Padrão para <i>Streptococcus pneumoniae</i>	70
Tabela 10 – Cálculos de Concentração Esperada - Pontos de Diluição Padrão <i>Streptococcus pneumoniae</i>	71
Tabela 11 - Valores de Ct e fluorescência – Ensaio de Sensibilidade Analítica – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	72
Tabela 12 - Cálculo dos Pontos de Diluição Padrão para <i>Haemophilus influenzae</i> ..	77
Tabela 13 – Cálculos de Concentração Esperada - Pontos de Diluição Padrão <i>Haemophilus influenzae</i>	78
Tabela 14 - Valores de Ct e fluorescência – Ensaio de Sensibilidade Analítica – <i>Haemophilus influenzae</i>	79
Tabela 15 – Análise Canais ROX e FAM – Ensaio de Especificidade Analítica – <i>Neisseria meningitidis</i>	84
Tabela 16 – Análise Canais CY5 e FAM – Ensaio de Especificidade Analítica – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	89
Tabela 17 – Análise Canais ROX e CY5 – Ensaio de Especificidade Analítica – <i>Haemophilus influenzae</i>	91
Tabela 18 – Ensaio de Repetibilidade	94
Tabela 19 – Ensaio de Reprodutibilidade	99
Tabela 20 – Ensaio de Exatidão/Acurácia	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CI MB	- Controle Interno kit XGEN MULTI MB
CLIA	- <i>Clinical Laboratory Improvement Amendments</i>
CLSI	- <i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CP MB	- Controle Positivo kit XGEN MULTI MB
Ct	- <i>Cycle Threshold</i>
DM	- Doença Meningocócica/ Meningite Meningocócica
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
FDA	- <i>Food and Drugs Administration</i>
Fab.	- Fabricante
HI	- <i>Haemophilus influenzae</i>
HRM	- Curva de <i>melting</i> de alta resolução
HSV1	- <i>Herpes simplex virus 1</i> (HSV1)
HSV2	- <i>Herpes simplex virus 2</i> (HSV2)
ISO	- <i>International Organization for Standardization</i>
IVD	- Diagnóstico <i>in vitro</i>
LOD	- <i>Limit of Detection</i>
LCR	- Líquor
MH	- Meningite por hemófilo
MIX MB	- Master Mix kit XGEN MULTI MB
MNE	- Meningite não especificada
MOB	- Meningite por outras bactérias
MOE	- Meningite por Outra Etiologia
MP	- Meningite por Pneumococos
MTBC	- Meningite tuberculosa
MV	- Meningite Asséptica/Viral

Nmeng	- <i>Neisseria meningitidis</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDS	- Padrão Sintético
qPCR	- PCR em Tempo Real
SBT	- <i>Sample Buffer Tube</i> / Tubo de Tampão de amostra
Spneu	- <i>Streptococcus pneumoniae</i>
SSM	- Sistema Síndrômico Multiplex
SSM MB	- Sistema Síndrômico Multiplex para diagnóstico de meningites bacterianas, formado pela plataforma totalmente automatizada BD Max™ System em conjunto com o painel molecular multiplex XGEN MULTI MB.
VZV	- Varicella-zoster vírus (VZV)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 PRINCIPAIS CAUSADORES DE MENINGITE BACTERIANA	18
3.1.1 <i>Neisseria meningitidis</i> (Nmeng).....	18
3.1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Spneu)	19
3.1.3 <i>Haemophilus influenzae</i> (HI)	19
3.2 DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL.....	20
3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	24
3.4 AUTOMAÇÃO NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR - SISTEMAS SINDRÔMICOS MULTIPLEX	26
3.5 PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO E ENSAIOS DE PERFORMANCE PARA TESTES <i>IN-HOUSE</i> OU PRODUTOS IVD ALTERADOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 PLATAFORMA TOTALMENTE AUTOMATIZADA BD MAX™ SYSTEM	44
4.2 PAINEL MOLECULAR MULTIPLEX XGEN MULTI MB	46
4.3 VALIDAÇÃO DE SISTEMA SINDRÔMICO MULTIPLEX PARA DIAGNÓSTICO DE MENINGITES BACTERIANAS (SSM MB)	49
4.3.1 Ensaios de Robustez.....	53
4.3.2 Ensaios de Sensibilidade Analítica – LOD	62
4.3.2.1 Ensaios de sensibilidade analítica - <i>Neisseria meningitidis</i>	63
4.3.2.2 Ensaios de sensibilidade analítica - <i>Streptococcus pneumoniae</i>	70
4.3.2.3 Ensaios de sensibilidade analítica - <i>Haemophilus influenzae</i>	76
4.3.3 Ensaios de Especificidade Analítica – “Cross-Reactivity”.....	83
4.3.3.1 Ensaios de especificidade analítica - <i>Neisseria meningitidis</i>	84
4.3.3.2 Ensaios de especificidade analítica - <i>Streptococcus pneumoniae</i>	88
4.3.3.3 Ensaios de especificidade analítica - <i>Haemophilus influenzae</i>	91
4.3.4 Ensaios de Precisão.....	93
4.3.4.1 Ensaios de repetibilidade	93
4.3.4.2 Ensaios de reprodutibilidade	98
4.3.5 Ensaios de Exatidão/Acurácia.....	101
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
5.1 ENSAIOS DE ROBUSTEZ	105

5.2 ENSAIOS DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA.....	106
5.3 ENSAIOS DE ESPECIFICIDADE ANALÍTICA	107
5.4 ENSAIOS DE PRECISÃO	108
5.5 ENSAIOS DE EXATIDÃO/ACURÁCIA	109
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
REFERÊNCIAS.....	113

1. INTRODUÇÃO

A palavra meningite significa inflamação das meninges, ou seja, é o processo inflamatório das membranas protetoras que envolvem o cérebro e a medula espinhal. Este processo pode ser causado tanto por vírus, bactérias, fungos, ou outros processos não-infecciosos, tendo como formas mais frequentes a meningite viral e a meningite bacteriana, ambas consideradas importantes em termos de saúde pública devido à sua capacidade de ocasionar surtos (BRASIL, 2019a).

No Brasil, a meningite é considerada uma doença endêmica, deste modo, são esperados casos da doença ao longo do ano, com ocorrência de surtos e epidemias ocasionais (BRASIL, 2019a). É uma doença de notificação compulsória imediata, sendo de responsabilidade dos serviços de saúde, públicos ou privados, e profissionais de saúde a notificação de todo caso suspeito em até 24 horas para as vigilâncias municipais e estaduais (BRASIL, 2017).

Para a investigação de casos, é utilizada a ficha de investigação de meningite, em que, após a confirmação da doença, é realizada a classificação como: doença meningocócica (DM), meningite tuberculosa (MTBC), meningite por outras bactérias (MOB), meningite de etiologia não especificada (MNE), meningite asséptica/viral (MV), meningite por outra etiologia (MOE), meningite por haemophilus (MH) ou meningite por pneumococos (MP) (BRASIL, 2019c).

De acordo com os dados de vigilância epidemiológica de abril de 2019, no Brasil, foram confirmados no período de 2010 a 2018, 148.286 casos de meningite, sendo estes classificados nas fichas de investigação como: 75.312 casos (50,8%) de MV; 26.439 casos (17,8%) de MNE; 16.797 casos (11,3%) de DM; 9.441 casos (6,4%) de MP; 8.970 casos (6,0%) de MOB; 6.834 casos (4,6%) de MOE; 3.349 casos (2,3%) de MTBC; e 1.144 casos (0,8%) de MH (BRASIL, 2019c).

Dentre os casos acima citados, apesar das MV apresentarem o primeiro lugar em relação ao número de registros, destaca-se como o quadro mais grave, em termos de vigilância epidemiológica, o grupo das meningites de origem bacteriana (MOB, DM, MP, MTBC e MH) devido a sua rápida evolução e letalidade, além de apresentar, quando somadas, o segundo maior número de registros com um total de 39.701 casos e uma representatividade de 26,8%.

Estima-se que haja anualmente mais de 1,2 milhões de casos de meningite bacteriana em todo o mundo, com coeficientes de incidência e letalidade que variam

de acordo com a região, país, faixa etária e agente etiológico. Casos sem tratamento podem chegar a atingir uma taxa de letalidade de até 70% (CDC, 2011).

Em relação ao diagnóstico, dentre as técnicas convencionais preconizadas pelo Ministério da Saúde destacam-se como os principais exames laboratoriais para o esclarecimento de casos suspeitos de meningite bacteriana: a cultura, o exame quimio citológico do líquido, a bacterioscopia direta e a aglutinação pelo látex (BRASIL, 2019a). Infelizmente, estes exames têm como desvantagem o longo tempo de procedimento para a identificação etiológica e diagnóstico, apesar de representarem o “padrão ouro” em termos de rotina laboratorial.

Como a evolução das meningites bacterianas é rápida, a identificação etiológica e o diagnóstico precoce são essenciais para a definição de tratamentos antimicrobianos adequados, instituição de medidas de controle e até mesmo para o monitoramento do perfil epidemiológico da doença. Lembrando também que, para que haja um diagnóstico efetivo das meningites bacterianas, são necessárias metodologias que possibilitem não só maiores informações para diagnóstico, mas resultados rápidos.

Neste contexto, pode-se dizer que os exames laboratoriais baseados nas técnicas de biologia molecular permitem a detecção dos agentes causadores da doença através de testes mais rápidos, com alta especificidade e sensibilidade. Além disso, como na área de biologia molecular uma das aplicações de maior demanda é a automação dos processos moleculares, o presente estudo propõe realizar a validação dos protocolos para extração e amplificação do painel molecular multiplex XGEN MULTI MB (Fab.: Mobius LifeScience, Ref. XG-MB-MB-24) em conjunto com a plataforma totalmente automatizada BD MAX™ System (Fab.: BD Diagnostics, Ref. BD MAX™ System), com o objetivo de se atingir maiores possibilidades para a rotina laboratorial.

O uso combinado destas metodologias dinamiza os processos de detecção por meio da criação de um sistema sindrômico multiplex, que proporciona resultados rápidos e objetivos. Este sistema, formado pelo painel molecular multiplex XGEN MULTI MB e a plataforma automatizada BD MAX™ System, quando utilizado para ensaios de detecção molecular de meningite bacteriana, é capaz de proporcionar resultados em até 3 horas, representando um avanço significativo quando comparado com os métodos de cultura ou até mesmo outras metodologias de diagnóstico laboratorial.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar o painel molecular multiplex XGEN MULTI MB (Fab.: Mobius LifeScience, Ref. XG-MB-MB-24) para uso em conjunto com a plataforma totalmente automatizada BD MAX™ System (Fab.: BD Diagnostics, Ref. BD MAX™ System), formando assim um sistema sindrômico multiplex utilizado para diagnóstico molecular de meningites bacterianas, a partir de agora denominado como SSM MB.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a efetividade de detecção dos patógenos contidos no painel molecular multiplex XGEN MULTI MB quando utilizado em conjunto com a plataforma automatizada BD MAX™ System, através de ensaios de robustez, especificidade e exatidão/acurácia;
- Estabelecer valores de sensibilidade e limites de detecção analíticos para o sistema sindrômico multiplex SSM MB;
- Avaliar a precisão do sistema sindrômico multiplex SSM MB através de ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRINCIPAIS CAUSADORES DE MENINGITE BACTERIANA

3.1.1 *Neisseria meningitidis* (Nmeng)

A bactéria *Neisseria meningitidis* (Nmeng) é um diplococo gram-negativo, aeróbio, imóvel, pertencente à família *Neisseriaceae*. A composição antigênica de sua cápsula polissacarídica permite sua classificação em 12 diferentes sorogrupos: A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y e Z, sendo que dentre estes sorogrupos, destacam-se os sorogrupos A, B, C, Y, W e X como os principais responsáveis pela ocorrência de infecções invasivas e, portanto, de epidemias (BRASIL, 2019a).

A infecção invasiva pela Nmeng pode apresentar um amplo espectro clínico, que varia desde febre transitória e bacteremia oculta até formas fulminantes, com a morte do paciente em poucas horas após o início dos sintomas.

Dentre as infecções por Nmeng, a meningite bacteriana e a doença meningocócica¹ são as formas clínicas mais observadas, podendo ocorrer tanto isoladamente quanto associadas. Em termos de sintomatologia, os quadros classificados como meningite bacteriana representam a forma mais frequente da infecção na forma invasiva, enquanto os quadros de doença meningocócica/meningococcemia, representam a forma mais grave (BRASIL, 2019a).

O quadro de meningite bacteriana pode se instalar em algumas horas, sendo iniciado com intensa sintomatologia, ou após alguns dias acompanhada de outras manifestações, geralmente indistinguíveis. No caso das meningites meningocócicas, observa-se, em cerca de 60% dos casos, a presença de lesões cutâneas e petéquias bastante características. E para os casos de meningococcemia, além do coma que pode sobrevir em algumas horas, observam-se também elevadas taxas de letalidade, geralmente acima de 40%, com grande maioria dos óbitos nas primeiras 48 horas do início dos sintomas (BRASIL, 2019a).

No Brasil, a doença meningocócica é uma infecção bacteriana aguda endêmica, com ocorrência de surtos esporádicos que acometem indivíduos de todas as faixas etárias. Destacam-se como os maiores coeficientes de incidência, com

¹De acordo com BRASIL (2019a, p.35) são classificadas como meningites bacterianas os quadros de meningite causados pela meningite meningocócica ou outras bactérias, e como doença meningocócica os quadros de meningite meningocócica com meningococcemia.

aproximadamente 30% dos casos notificados, os casos referentes a crianças menores de 5 anos de idade, principalmente lactentes, no primeiro ano de vida (BRASIL, 2019a).

3.1.2 *Streptococcus pneumoniae* (Spneu)

O *Streptococcus pneumoniae* ou pneumococo (Spneu) são diplococos gram-positivos em forma de lanceta pertencentes à família *Streptococcaceae*, comumente encontrados na mucosa da nasofaringe e orofaringe de seres humanos sadios (VIEIRA et al, 2007).

Com mais de 90 sorotipos capsulares imunologicamente distintos, é o principal agente etiológico de pneumonias e de doenças invasivas em crianças e adultos como a doença pneumocócica invasiva (meningite, pneumonia bacteriêmica, sepse e artrite) e não invasiva (sinusite, otite média aguda, conjuntivite, bronquite e pneumonia) (BRASIL, 2019a).

É o patógeno bacteriano mais comum em casos de otite média aguda e pneumonia, e o segundo mais importante em casos de meningite em crianças menores de 2 anos (BRASIL, 2019a). Nos Estados Unidos e Europa, 25 a 40 % dos casos de meningite são causados por esse agente etiológico (VIEIRA et al., 2007).

No Brasil a incidência é mais elevada em pacientes menores de 2 anos de idade, maiores de 60 anos ou em determinados grupos de indivíduos que apresentam condições associadas ao desenvolvimento de doenças invasivas por pneumococo (BRASIL, 2019a). Além disso, acometem de forma mais grave as populações mais carentes, agravando ainda mais a situação social dessas populações (BRICKS; BEREZIN, 2006).

3.1.3 *Haemophilus influenzae* (HI)

O *Haemophilus influenzae* (HI) é um cocobacilo gram-negativo que, de acordo com sua estrutura química de camada externa polissacarídea, pode ser classificado como capsulado ou não-encapsulado. Em sua forma não-encapsulada se encontra nas vias respiratórias de forma saprófita, podendo causar infecções assintomáticas ou doenças não invasivas, tais como bronquite, sinusites e otites, tanto em crianças quanto em adultos (BRASIL, 2019a). Já na forma capsulada pode ser classificado em seis sorotipos distintos (A, B, C, D, E, F), tendo o sorotipo B como o principal

causador de doença invasiva na infância, incluindo meningites, epiglotites, septicemias, osteomielites, artrites e doenças não-invasivas, como pneumonias e otites (NASCIMENTO-CARVALHO; DE ANDRADE, 2006).

Em função da sua frequência na orofaringe da população geral, o contágio acontece principalmente nos primeiros anos da infância ou até mais precocemente, de acordo com o desenvolvimento socioeconômico da população. Dentre os quadros clínicos provocados pelo HI, a meningite corresponde ao quadro mais frequentemente realizado (FREITAS; MERCHAN-HAMANN, 2004). Também vale a pena lembrar que o HI já foi o principal patógeno causador de meningite bacteriana, porém a epidemiologia mudou com o advento dos programas de vacinação infantil (BRASIL, 2019c).

Antes da introdução da vacina conjugada, a incidência de meningite por HI variava de 15 a 60 por 100.000 menores de cinco anos nos países desenvolvidos e de 35 para cada grupo de 100.000 crianças menores de cinco anos, em países latino-americanos (FREITAS; MERCHAN-HAMANN, 2004). Atualmente no Brasil, de acordo com os dados de vigilância epidemiológica, em 2018 registrou-se uma incidência de meningite por HI de 0,07 para cada grupo de 100.000 habitantes (BRASIL, 2019c).

3.2 DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

As infecções que envolvem o sistema nervoso central são doenças clínicas graves, geralmente associadas a altas taxas de morbidade, mortalidade e com sequelas significativas a longo prazo, como: problemas de visão, audição, déficits cognitivos, convulsões e alterações comportamentais. Portanto, a realização do diagnóstico precoce, juntamente com a diferenciação de seus patógenos causadores, são considerados requisitos essenciais para a definição do tratamento adequado e consequente redução do risco de sequelas e/ou morte, além de limitar a propagação da doença e desperdício de recursos em tratamentos ineficazes (LEBER et al., 2016; PICCIRILLI et al., 2018; RODRIGUES; DESAI; FERNANDES, 2016).

Em geral, como somente as características clínicas não podem determinar a presença ou ausência das meningites, o diagnóstico diferencial é realizado por meio da combinação entre suspeita clínica e diagnóstico laboratorial. Assim, o processo

de diagnóstico diferencial se inicia com a suspeita clínica de um provável agente etiológico, que segue para uma série de testes laboratoriais para detectar o patógeno (DAS; SHIBIB, 2017; VERNON, 2017; TROTTER et al., 2019).

No caso do diagnóstico diferencial por meio de suspeita clínica, destacam-se as observações de Arruda Parente Filho et al. (2018), que com o objetivo de abranger a maior quantidade de casos suspeitos, sugerem a alteração da clássica tríade de sintomas (previamente compostos por condições mentais, rigidez cervical e febre) para uma téttrade (com a inclusão da cefaleia). Deste modo, mesmo que poucos pacientes apresentem todos os sintomas previamente citados, pelo menos dois sintomas da téttrade estarão presentes em 95% dos casos.

Já no caso do diagnóstico diferencial por meio de diagnóstico laboratorial, diversas técnicas são utilizadas para o esclarecimento do diagnóstico de casos suspeitos de meningite. No entanto, de acordo com Guia de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2019a, p.36), são descritas como principais as técnicas mencionadas abaixo:

Cultura: realizada com diversos tipos de fluidos corporais. É considerada o padrão ouro para diagnóstico da doença meningocócica. Tem como objetivo o isolamento de bactérias para identificação de espécie, e posteriormente o sorogrupo, sorotipo e sorosubtipo do meningococo invasivo

Exame quimiocitológico de líquido: permite a contagem diferencial das células além das dosagens de glicose e proteínas do líquido.

Bacterioscopia direta: realizada a partir do líquido e outros fluidos corpóreos. A coloração do líquido pela técnica de gram permite, ainda que com baixo grau de especificidade, caracterizar morfológica e tintorialmente as bactérias presentes.

Agglutinação pelo látex: utilizada na detecção do antígeno bacteriano em amostras de líquido e soro, ou outros fluidos biológicos através de partículas de látex sensibilizadas com antissoros específicos, que permitem a detecção do antígeno bacteriano nas amostras.

Ao analisar as técnicas previamente mencionadas, especificamente para o diagnóstico de meningites bacterianas, verifica-se que apesar do Guia de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2019a) ser um documento atual, nem todas as técnicas indicadas como principais podem ser consideradas como as melhores opções para o diagnóstico laboratorial. Como exemplo temos o exame quimiocitológico do líquido que não é indicada para o diagnóstico devido ao baixo grau de especificidade; a bacterioscopia direta que possui uma sensibilidade de 60% a 80% em pacientes sem exposição prévia a antibióticos, e de 40% a 60% em pacientes em uso de antibióticos (GUTIERREZ; EMMANUEL, 2018); e a técnica de agglutinação pelo látex

que pode resultar em falso-positivos em indivíduos portadores do fator reumático ou em reações cruzadas com outros agentes (BRASIL, 2019a) (Quadro 1).

Até mesmo a técnica de cultura, que ainda é considerada como o padrão-ouro para detecção de patógenos, devido ao seu alto grau de especificidade em amostras de líquido, apresenta importantes desvantagens relacionadas ao diagnóstico tais como: necessidade de no mínimo 12 a 48 horas para a obtenção de um diagnóstico definitivo; limitações severas em amostras de pacientes que receberam antibióticos anteriormente; e dependência dos processos relacionados a fase pré-analítica (por exemplo, baixa qualidade da amostra, mal acondicionamento após coleta, atraso no processamento da amostra no laboratório, etc.) (DE ALMEIDA et al., 2019).

Além disso, segundo Wagner et al. (2018), para os casos de amostras com problemas pré-analíticos ou oriundas de pacientes que fizeram uso de antibióticos antes da punção lombar, cerca de 50% dos casos suspeitos de meningite bacteriana não podem ser confirmados pela técnica.

Portanto, devido às principais técnicas de diagnóstico laboratorial no Brasil serem baseadas ou na cultura microbiológica, ou em outros métodos que oferecem baixa especificidade e sensibilidade clínica, os médicos são forçados a confiar no diagnóstico clínico, ao invés dos testes diagnósticos. Fato o que nem sempre é uma boa opção para doenças como a meningite bacteriana, considerando que o próprio diagnóstico clínico e sintomas da doença são semelhantes a uma ampla gama de patógenos, tornando o diagnóstico clinicamente indistinguível (RODRIGUES; DESAI; FERNANDES, 2016; FORBES et al., 2018; TROTTER et al., 2019)

Deste modo, para realização de um diagnóstico preciso, observa-se que se faz necessário a realização de uma bateria de ensaios que vão além dos métodos de diagnóstico tradicional. Neste ponto, destacam-se os ensaios moleculares que com a modernização dos laboratórios de microbiologia clínica têm desempenhado um papel cada vez mais importante, devido à sua sensibilidade, velocidade e eficácia de custo (FORBES et al., 2018).

Quadro 1 - Técnicas convencionais para diagnóstico de meningites bacterianas

Técnica	Metodologia	Tempo Médio	Vantagens	Desvantagens
Aglutinação pelo látex	Detecção do antígeno bacteriano.	15-30 min.	Técnica rápida.	Resultados falso-positivos.
Bacterioscopia direta	Coloração do LCR pela técnica de Gram.	0,5 -1 hr.	Caracterização morfológica e tintorial das bactérias presentes.	Baixo grau de sensibilidade.
Exame quimiocitológico de líquido	Contagem e o diferencial das células e dosagem de glicose e proteínas do LCR.	0,5 -1 hr.	Traduz a intensidade do processo infeccioso e orienta a suspeita clínica.	Baixo grau de especificidade, não indicado para conclusão do diagnóstico final.
Cultura	Isolamento da bactéria para identificação da espécie, e posteriormente o sorogrupo, sorotipo e sorosubtipo.	12 – 48 hrs.	Alto grau de especificidade/ padrão ouro.	Mínimo de 12-48 horas para diagnóstico; limitações em amostras previamente tratadas com antibióticos; dependente dos processos relacionados a fase pré-analítica.

Fonte: Adaptado de BRASIL, (2019); DE ALMEIDA et al., (2019); GUTIERREZ; EMMANUEL, (2018).

3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Os exames laboratoriais por biologia molecular constituem uma importante ferramenta para o diagnóstico das meningites bacterianas, pois em geral são técnicas menos influenciadas pelas condições da amostra do que a cultura e normalmente podem ser finalizadas no mesmo dia (DUARTE; DONALISIO; FRED, 2014). Técnicas como a PCR em tempo real (qPCR), por exemplo, permitem que os agentes causadores sejam identificados mais rapidamente, com alta especificidade e sensibilidade, possibilitando o início do tratamento mais rapidamente e reduzindo a chance de evolução do quadro clínico.

Em geral, a qPCR já está validada no Brasil, sendo a técnica utilizada na rotina diagnóstica das meningites bacterianas em alguns Lacens e no Laboratório de Referência Nacional (BRASIL, 2019a). No entanto, constituem em sua maioria de testes singleplex, ou seja, testes capazes de identificar apenas um patógeno por vez e, por isso, quando comparados com a cultura, que permite o crescimento de diferentes tipos organismos em um único teste, acabam tornando-se desvantajosos, apesar de fornecerem resultados mais rápidos e com alta sensibilidade (RELICH; ABBOTT, 2018).

Atualmente, já estão disponíveis no mercado técnicas mais recentes que podem ajudar a fornecer um diagnóstico mais rápido e preciso, além de fornecer um painel mais amplo de resultados. A qPCR multiplex, por exemplo, é capaz de realizar a detecção de vários alvos em um único teste, possibilitando a criação de painéis moleculares multiplex que podem ser aplicados nos laboratórios de microbiologia clínica e em diversas áreas de diagnóstico.

Os painéis moleculares multiplex, quando compostos por organismos clinicamente significativos, podem fornecer soluções de diagnóstico associado ou específicos da doença, devido a capacidade de identificação de uma maior variedade de patógenos (PATEL, 2016; RELICH; ABBOTT, 2018). Além disso, quando comparados com os métodos de qPCR tradicionais, têm como principais vantagens: a) tempo de resposta reduzido; b) detecção aprimorada de infecções mistas; c) detecção de patógenos que poderiam não fazer parte inicialmente do diagnóstico diferencial; d) simplificação dos processos de pedido, coleta de amostras e análise, que em técnicas qPCR singleplex são realizadas de modo individual por patógeno (SIMNER et al., 2017; RELICH; ABBOTT, 2018).

De acordo com Das; Shibib; Vernon (2017, p.161), embora a maioria das agências internacionais de saúde pública enfatize o uso de testes moleculares como complemento e não para a substituição da cultura, estes testes podem ser utilizados como um meio de diagnóstico precoce, por facilitar:

- (1) a implementação oportuna de estratégias de controle de infecção, como o isolamento aéreo;
- (2) a instituição precoce de terapia apropriada que possa influenciar drasticamente os resultados dos pacientes;
- (3) a notificação antecipada das autoridades de saúde pública que levam a intervenções em casa, local de trabalho, escola e outros contextos sociais ou profissionais;
- (4) a descontinuação de precauções de isolamento aéreo e redução no número de investigações de contato de pacientes com testes moleculares negativos, de acordo com as diretrizes do Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Relich; Abbott (2018) também defendem que a implementação de painéis moleculares multiplex diminui o tempo para a terapia apropriada, melhora da sobrevivência do paciente e diminui custos gerais relacionados à assistência médica. Além do mais, em termos de diagnóstico de meningite bacteriana, o uso destes painéis moleculares multiplex, quando comparado com a abordagem convencional de terapêutica de amplo espectro, têm como vantagens: a) estabilidade e menor influência em relação às condições da amostra; b) possibilidade de fornecer resultados no mesmo dia; c) capacidade de promover uma terapia antimicrobiana específica, por meio de diagnóstico e decisões mais rápidas, tanto em termos de tratamento, quanto para medidas de controle de infecção (DUARTE; DONALISIO; FRED, 2014; DAS; SHIBIB; VERNON, 2017; SIMNER et al., 2017).

Deste modo, considerando que nas últimas décadas os laboratórios de microbiologia clínica passaram a ter um papel fundamental na prevenção e controle de infecções nos serviços de saúde e na comunidade, a rápida adaptação para a implementação de tecnologias moleculares no campo da microbiologia clínica, tornou-se uma necessidade para o gerenciamento de doenças infecciosas, especialmente em relação às práticas de controle de infecções (DAS; SHIBIB; VERNON, 2017).

Outro ponto importante a ser mencionado é em relação ao avanço da tecnologia, que atualmente exige que o principal foco dos laboratórios esteja nos tempos de resposta rápidos e automação. Neste sentido, a capacidade de alguns

painéis moleculares multiplex em serem incorporados em sistemas automação, pode trazer diversos benefícios para o diagnóstico.

3.4 AUTOMAÇÃO NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR - SISTEMAS SINDRÔMICOS MULTIPLEX

A utilização de sistemas automatizados por si só oferece benefícios substanciais aos laboratórios, administradores, clínicos e ao paciente como: resultados mais rápidos e precisos; eficiência aprimorada do fluxo de trabalho; testes de alto rendimento; redução de custos de laboratório; redução de erros humanos; e na maioria das vezes, economia de espaço (SNYDER, 2016).

Portanto, a utilização de sistemas automatizados em conjunto com painéis moleculares multiplex possibilita a criação de sistemas sindrômicos de diagnóstico, também conhecidos como Sistemas Sindrômicos Multiplex (SSM)², que trazem consigo tanto os benefícios descritos para os processos de automação, quanto os benefícios previamente descritos para os painéis moleculares multiplex; além de possuírem vantagens de natureza logística e financeira como: diminuição do número de métodos necessários para detecção de uma mesma diversidade de patógenos; redução do tempo prático do técnico; maior eficiência e produtividade na rotina do laboratório (RELICH; ABBOTT, 2018).

Com tecnologias, complexidade e tempo prático variáveis, os SSM podem atuar em inúmeras aplicações como: detecção de bactérias e marcadores de resistência antimicrobiana em frascos positivos para hemocultura; detecção de patógenos agudos de gastroenterite nas fezes; detecção de patógenos respiratórios em amostras respiratórias e no líquido cefalorraquidiano; detecção de patógenos causadores de meningite aguda e encefalite no líquido cefalorraquidiano; entre outros (PATEL, 2016).

Em termos de diagnóstico de meningites bacterianas, Das; Shibib; Vernon (2017) descrevem que, apesar de apenas recentemente os SSM começarem a ser utilizados nos laboratórios e apresentarem dados ainda limitados, seus dados de desempenho inicial parecem promissores e benéficos.

²Lembrando que são considerados como Sistemas Sindrômicos Multiplex (SSM), apenas a plataformas que apresentam performances totalmente automatizadas, ou seja, as que realizam todas as etapas necessárias para execução da técnica como: extração, montagem de placa e inserção no equipamento de amplificação de modo automatizado, sendo de responsabilidade do usuário apenas inserir a amostra inicial no equipamento e depois analisar os resultados.

Já em termos de presença, visibilidade e disponibilidade no mercado, segundo Relich; Abbott (2018), destacam-se nos Estados Unidos os SSM descritos abaixo:

- a) **BD Max™ System (BD Diagnostics, Quebec, Canadá):** sistema para extração automatizada de ácido nucleico e detecção por PCR em tempo real automatizada através de sondas de hidrólise TaqMan™. Projetado para executar ensaios singleplex e ensaios definidos pelo usuário como plataforma aberta/personalizáveis. Até 24 ensaios podem ser executados simultaneamente e os resultados estão disponíveis dentro de 3 horas.
- b) **Sistemas ePlex® e ePlex® NP (GenMark Diagnostics, Inc., Carlsbad, Califórnia):** utilizam a tecnologia eSensor patenteada, todas as etapas de manuseio de líquidos são realizadas por tecnologia microfluídica digital (eletrowetting). Os resultados geralmente estão disponíveis em 90 minutos, e de 3 a 24 ensaios podem ser executados simultaneamente, dependendo da configuração do instrumento.
- c) **Sistema FilmArray® (BioFire Diagnostics e Bio-Fire Defense, LLC, Salt Lake City, Utah):** incorpora reagentes liofilizados e frascos de reação em uma pequena bolsa de filme plástico encoberta por um cartucho de plástico sólido, que é posteriormente carregado no instrumento FilmArray para extração automatizada de ácido nucleico, PCR em tempo real e detecção por curva de *melting* de alta resolução (HRM). Os resultados geralmente estão disponíveis em aproximadamente 60 minutos e, assim como os Sistemas ePlex, a quantidade de ensaios pode ser escalonada, dependendo da configuração do instrumento.
- d) **Unyvero™ System (Curetis USA Inc., San Diego, Califórnia):** utiliza PCR para detectar uma variedade de patógenos bacterianos e genes de resistência antimicrobiana. O sistema é composto por três componentes de hardware: um dispositivo de lise de amostra (Unyvero L4 Lysator), um analisador de painel (Unyvero A50 Analyzer) e uma interface de computador com tela *touchscreen* com scanner de código de barras (Unyvero C8 Cockpit). Até 2 ensaios podem ser executados simultaneamente e os resultados estão disponíveis dentro de 4 a 5 horas.
- e) **Sistema VERIGENE® (Luminex Corporation, Austin, Texas):** sistema composto pelos módulos de teste Processor SP e leitor VERIGENE Reader. São carregadas no Processor SP a bandeja de extração contendo amostra, cartucho de testes, conjunto de suporte de ponteiros e bandeja de utilidades, onde dentro do cartucho, a extração automatizada de ácido nucleico, purificação, amplificação e hibridação das moléculas alvo é realizada através da tecnologia NanoGrid. Após a etapa de processamento, o módulo de teste é colocado no VERIGENE Reader para leitura dos resultados. Os resultados geralmente estão disponíveis em menos de 3 horas, múltiplas unidades Processor SP podem ser combinadas com um único leitor para testes simultâneos amostras.

No Brasil, como a comercialização de produtos para diagnóstico *in vitro* (IVD) está autorizada apenas após a anuência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para obtenção dos dados de presença, visibilidade e disponibilidade no mercado previamente mencionados, primeiramente, é necessário realizar uma

busca no banco de dados de dispositivos médicos disponível no portal da ANVISA (<https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/>), com o objetivo de identificar quais os SSM, atualmente utilizados no diagnóstico de meningites bacterianas, que estão registrados e disponíveis para uso no país (Quadro 2).

Para esta busca são considerados como SSM apenas os sistemas que utilizam plataformas totalmente automatizadas registradas. Ou seja, não são consideradas outras possibilidades de sistemas, como sistemas utilizados em conjunto com plataformas semiautomatizadas (uma vez que uso é dependente do usuário), ou sistemas montados pelo usuário/sistemas obtidos através da combinação de plataformas distintas (uma vez que apresentam registro para os equipamentos isolados, mas não para uso do sistema como conjunto).

Além disso, como foi observado a existência de plataformas totalmente automatizadas designadas tanto para uso em modo fechado, quanto para uso em modo aberto/personalizável³, também foi realizada uma segunda busca no banco de dados dispositivos médicos, com o objetivo de identificar quais são os painéis moleculares multiplex, utilizados no diagnóstico de meningites bacterianas, que estão registrados e disponíveis no país (Quadro 3).

³É aplicado o termo SSM que atua de modo fechado quando a plataforma automatizada e o painel molecular multiplex funcionam somente com os materiais fornecidos pelo fabricante. E é aplicado o termo SSM que atua de modo aberto/personalizável quando a plataforma automatizada e os painéis moleculares multiplex são de fornecedores/marcas distintas.

Quadro 2 – Plataformas totalmente automatizadas utilizadas no diagnóstico de meningites bacterianas registradas na ANVISA.

Nome da Plataforma	Fabricante	Tipo de Sistema	Metodologia	Nº Amostras processadas/ rodada	Tempo Médio	Nº Registro ANVISA
BD Max™ System	Becton Dickinson and Company	Ambos ¹	Extração automatizada e detecção qPCR automatizada através de sondas de hidrólise TaqMan™.	24	3 hrs.	10033430638
FilmArray®	Biofire Diagnostics LLC	Fechado	Extração automatizada de ácido nucleico, PCR em tempo real, detecção e etapas de melting de alta resolução.	1	1 hr.	10158120685
FilmArray® Torch				2 – 12 ²		10158120712
FilmArray® 2.0				1 – 8 ²		10158120704

¹Utiliza tanto sistema fechado quanto sistema aberto/personalizável. ²De acordo com a configuração do equipamento.

Fonte: Adaptado de RELICH; ABBOTT, 2018 e ANVISA (http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/banco-de-dados-traz-informacoes-de-produtos-para-saude/219201). Acesso em 12 de maio de 2020.

Quadro 3 - Painéis Moleculares Multiplex para detecção de meningites bacterianas registrados na ANVISA

Nome do Ensaio – Painel	Fabricante	Metodologia	Quantidade de Patógenos Detectados	Patógenos Detectados	Nº Registro ANVISA
<i>FilmArray</i> ® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel	Biofire Diagnostics LLC	qPCR com detecção por curva de melting de alta resolução (HRM)	14	<ul style="list-style-type: none"> ● Escherichia coli K1 ● Haemophilus influenzae ● Listeria monocytogenes ● Neisseria meningitidis ● Streptococcus agalactiae ● Streptococcus pneumoniae ● Citomegalovírus (CMV) ● Enterovírus (EV) ● Herpes simplex vírus 1 (HSV-1) ● Herpes simplex vírus 2 (HSV-2) ● Human herpesvirus 6 (HHV-6) ● Human parechovirus (HPeV) ● Varicella zoster vírus (VZV) ● Cryptococcus neoformans/gattii 	10158120699
XGEN MULTI MB	Mobius LifeScience	qPCR Multiplex	3	<ul style="list-style-type: none"> ● Haemophilus influenzae ● Neisseria meningitidis ● Streptococcus pneumoniae 	80502070038
Speed-Oligo® Bacterial Meningitis	Vircell S.L.	PCR convencional seguida de Hibridização com detecção oligocromatográfica	3	<ul style="list-style-type: none"> ● Haemophilus influenzae ● Neisseria meningitidis ● Streptococcus pneumoniae 	80263710030

Fonte: Adaptado de ANVISA (http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/banco-de-dados-traz-informacoes-de-produtos-para-saude/219201). Acesso em 12 de Maio de 2020.

Deste modo, após a análise dos resultados obtidos observa-se que: (1) para o Quadro 2, há uma quantidade ordinária de plataformas totalmente automatizadas disponíveis para o segmento; (2) para o Quadro 3, há uma diferença considerável no número de patógenos detectados entre os painéis moleculares multiplex identificados; (3) ao analisar a compatibilidade entre as plataformas totalmente automatizadas identificadas no Quadro 2 e os painéis moleculares multiplex identificados no Quadro 3, as únicas opções de SSM que poderiam ser gerados seriam: a) SSM fechado *FilmArray*®, composto por qualquer uma das plataformas *FilmArray*® registradas mencionadas no Quadro 2, em conjunto com o painel molecular multiplex *FilmArray*® Meningitis/ Encephalitis (ME) Panel; b) SSM personalizado, composto pelo sistema BD Max™ System em conjunto com o painel molecular multiplex XGEN MULTI MB⁴.

Assim, em relação ao ponto (1), questiona-se se o cenário levantado seria devido a um *déficit* de desenvolvimento nesta área, ou se os laboratórios estão preferindo/necessitando utilizar outros modelos ensaio devido a custo ou outros fatores não abordados.

Segundo Relich; Abbott (2018), em termos de custo-benefício e ao comparar os SSM com outros métodos, observa-se que quando vários testes de diagnóstico são solicitados, a abordagem sindrômica costuma ser mais barata do que a bateria de exames tradicionais necessários para obter um resultado de diagnóstico. Portanto, mesmo com o custo por teste dos SSM sendo frequentemente mais caro que o custo por teste de outros métodos (ex. cultura, sorologia etc.), as desvantagens relacionadas ao preço dos SSM são frequentemente superadas por meio desta abordagem. Exceto para os SSM designados para uso em sistema fechado, pois por operarem sob um sistema de venda fechado para equipamentos e insumos, impossibilitam o usuário à busca de outras opções e serviços mais baratos, representando assim um maior valor agregado para os laboratórios.

Em relação ao ponto (2), verifica-se que apesar da maioria dos fabricantes ter como objetivo a criação de soluções que permitam a identificação da maior variedade de patógenos possíveis, nem sempre o uso de um painel maior é melhor em termos de diagnóstico, pois pode levar à confusão clínica, ou detecção de

⁴Lembrando que nos casos de SSM abertos/personalizáveis, mesmo que a plataforma automatizada e o painel molecular multiplex estejam registrados na ANVISA, em termos de utilização para uso IVD, o conjunto deve ser previamente validado pelo laboratório ou fabricante para liberação de resultados de diagnóstico.

patógenos comensais não relacionados a sintomatologia do paciente (PATEL, 2016; RELICH; ABBOTT, 2018).

Deste modo, conforme abordado por Patel (2016), para a escolha do produto mais adequado para a rotina, é importante que: a) seja realizado o levantamento histórico dos patógenos detectados *versus* o quadro em análise; b) sejam definidos quais são os organismos clinicamente significativos associados ao processo ou síndrome específica da doença, capazes de fornecer soluções de diagnóstico mais completas; c) sejam analisadas quais serão as estratégias de condução dos testes.

Por fim, em relação ao ponto (3), verifica-se que os baixos índices de compatibilidade entre plataformas e painéis moleculares multiplex (Quadros 2 e 3) pode estar relacionado a falta de opções de SSM que trabalhem em sistema aberto/personalizado. Como exemplo, temos a análise realizada para o Quadro 2, onde dos quatro SSM listados, apenas um está designado para uso em sistema aberto/personalizável.

Como no Brasil, para implementação de qualquer sistema no mercado é essencial o equilíbrio entre performance, custo, complexidade, infraestrutura e população-alvo. A ausência de uma variedade de plataformas que trabalhem em sistema aberto/personalizável dificulta o acesso e conhecimento dos usuários/laboratórios para este tipo de sistema, que conseqüentemente diminui a demanda de criação de outros SSM abertos/personalizáveis no mercado, gerando os baixos índices de compatibilidade vistos.

Portanto, verifica-se que para melhoria do cenário atualmente visto, o uso de SSM abertos/personalizáveis deve ser considerado como uma vantagem em relação aos demais, pois permitem a implementação de vários exames em uma única plataforma, ao invés de trabalhar com diversas plataformas de acordo com o exame. Também é imprescindível o crescimento deste tipo de sistema no mercado e o conseqüente aumento de validações de painéis moleculares multiplex em conjunto com plataformas totalmente automatizadas para criação de novos SSM abertos/personalizáveis.

3.5 PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO E ENSAIOS DE PERFORMANCE PARA TESTES *IN-HOUSE* OU PRODUTOS IVD ALTERADOS

De acordo com a norma DIN EN ISO 15189, é exigido a realização de procedimentos de verificação ou validação antes da implementação de qualquer

teste de diagnóstico em um laboratório. Estes procedimentos, que geralmente são constituídos por ensaios de performance diversos, têm como objetivo averiguar se os requisitos de aplicação e uso pretendido foram corretamente atendidos para o teste em análise (RABENAU et al., 2007; NEWMAN; MARITZ, 2017).

O procedimento de verificação, de acordo com a norma DIN EN ISO 9000, é definido como "confirmação através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos especificados foram cumpridos", já o procedimento de validação, também de acordo com a norma DIN EN ISO 9000, é definido como "confirmação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para um uso ou aplicação específica foram cumpridos" (JENNINGS; VAN DEERLIN; GULLEY, 2009, p. 745 apud ISO, 2005). Assim, apesar de ambos os termos parecerem semelhantes, é considerado que o procedimento de validação vai um passo além da verificação, sendo um processo de maior complexidade e extensão.

Atualmente, no Brasil, nos Estados Unidos e países pertencentes à União Europeia, a escolha entre um procedimento de verificação ou um procedimento de validação varia se: (1) o teste já foi previamente aprovado como "produto IVD"⁵ pelo órgão regulamentador do país; (2) o teste foi de desenvolvimento próprio (*in-house*) ou é um produto IVD alterado (RABENAU et al., 2007; JENNINGS; VAN DEERLIN; GULLEY, 2009).

Para os testes previamente aprovados como produto IVD pelo órgão regulamentador, como o fabricante é responsável por toda a performance do produto, cabe ao usuário/laboratório verificar apenas se os requisitos especificados foram cumpridos. Nestes casos, a confirmação de desempenho do produto IVD é realizada através de procedimentos de verificação, sendo necessário a realização de ensaios de performance de exatidão e precisão (RABENAU et al., 2007).

Já nos casos de testes *in-house* ou produtos IVD alterados, entende-se que tanto os laboratórios que desenvolvem testes *in-house* quanto os que combinam, modificam ou mesmo substituem os produtos IVD regulamentados, agem como fabricantes do produto. Portanto, é necessário a realização de procedimentos de validação, sendo de responsabilidade do usuário/laboratório a correta definição e

⁵Lembrando que a expressão "produtos IVD", não abrange apenas os dispositivos médicos individuais, mas também sistemas de testes caso seja necessário mais de um componente para gerar um resultado diagnóstico.

aplicação dos ensaios de performance realizados (RABENAU et al., 2007; JENNINGS; VAN DEERLI; GULLEY, 2009).

Atualmente, observa-se que a ausência de definições em relação a quais ensaios de performance são necessários para realização do procedimento de validação acaba contribuindo para uma falta de padronização entre os autores, tanto em relação aos termos utilizados, quanto em relação a quais os ensaios de performance são mais indicados para realização de procedimentos de validação. Como consequência, esta falta de padronização além de contribuir para que os métodos permaneçam subdesenvolvidos, pode acabar impactando na garantia de qualidade dos ensaios realizados e, posteriormente, nos produtos distribuídos no mercado (NEWMAN; MARITZ, 2017).

Deste modo, com o objetivo de obter uma melhor compreensão dos termos utilizados no procedimento de validação e seus requisitos de performance, foi realizado um levantamento a partir de artigos considerados referência no âmbito europeu e americano, representados por Rabenau et al (2007) e Jennings; Van Deerlin; Gulley (2009), respectivamente; artigos recentes na literatura como o de Newman; Maritz (2017) e definições regulatórias brasileiras representado por BRASIL (2016), para que se pudesse identificar: (1) quais os termos e definições utilizados nos ensaios de performance para uso IVD (Quadro 4)⁶; (2) quais os ensaios de performance recomendados para validação de testes *in-house* ou produtos IVD alterados (Quadro 5)⁷; (3) qual o quantitativo de amostras indicado para realização dos ensaios de performance (Quadro 6)⁸.

Em relação aos termos e definições utilizados nos ensaios de performance para uso IVD (Quadro 4), observa-se que alguns termos podem ser considerados difíceis de se aplicar ou ambíguos de acordo com o tipo de análise que se pretender realizar. Como exemplo temos, para testes de resultado qualitativo, o termo exatidão/acurácia que pode ser considerado difícil de aplicar, pois a definição

⁶De modo a evitar problemas ou erros de interpretação, foram mantidas as definições no idioma original.

⁷Como a referência BRASIL, (2016) é composta basicamente de definições regulatórias em que não são definidos os testes necessários para realização dos ensaios de performance, este documento não foi considerado no Quadro 5.

⁸Como os autores JENNINGS; VAN DEERLIN; GULLEY, 2009 e BRASIL, 2016 não mencionam a quantidade de testes necessários para realização dos ensaios de performance, estes documentos não foram considerados no Quadro 6.

“proximidade com um valor verdadeiro” utilizada por Rabenau et al. (2007) e BRASIL, (2016) não se aplica, já que nestes tipos de ensaio é dado apenas a opção de resultado “correto” ou “incorreto”. Outro exemplo, são os termos sensibilidade e especificidade, que foram definidos de maneira diferente por diversos autores e organizações, e acabaram tornando seu significado ambíguo e dependente do tipo de teste. Tanto que, de acordo com Jennings; Van Deerlin; Gulley (2009), é sugerido evitar o termo sensibilidade analítica e usar os termos “Limite de Detecção (LOD)” ou “acordo positivo com um método comparativo”.

Em relação aos ensaios de performance recomendados para validação de testes *in-house*/produtos IVD alterados (Quadro 5), verifica-se que apesar de em termos de regulamentação ser considerada responsabilidade do usuário/laboratório de decidir o método mais apropriado para validar os ensaios de performance, ainda existe uma necessidade de padronização no meio, pois vários autores acabam adotando definições e testes distintos para os ensaios de performance, especialmente na validação de testes moleculares.

Por exemplo, para Rabenau et al. (2007), os ensaios de performance que devem ser realizados em procedimentos de validação de testes *in-house*/produtos IVD alterados são: exatidão/acurácia; sensibilidade; especificidade; precisão; e, se o produto IVD fornece um resultado quantitativo, linearidade. Os autores também defendem que é necessário validar todas as amostras/matrizes que serão utilizadas no laboratório, pois a matriz pode ter uma forte influência nos resultados. Além disso, para testes de efeitos induzidos/substâncias interferentes, a matriz das amostras validadas deve ser idêntica à amostra do paciente. Observa-se também que os autores não fazem a distinção ensaios analíticos e clínicos para os ensaios de sensibilidade e especificidade (Quadro 5).

Já para Jennings; Van Deerlin; Gulley (2009), os ensaios de performance que devem ser realizados em procedimentos de validação de testes *in-house*/produtos IVD alterados são: (1) para testes de resultado qualitativo: exatidão/acurácia⁹, precisão, robustez e substâncias interferentes¹⁰; (2) para testes de resultado

⁹Os autores destacam que para testes qualitativos o termo “exatidão/acurácia” é equivalente a sensibilidade e especificidade.

¹⁰Os autores destacam que para testes qualitativos o FDA considera o termo “substâncias interferentes” similar a Especificidade Analítica ou Reatividade Cruzada.

semiquantitativo¹¹ ou quantitativo: todos os ensaios mencionados no tópico (1) somados a ensaios de linearidade, sensibilidade analítica/limite de detecção, sensibilidade clínica e especificidade clínica. Além disso, os autores também defendem a realização de quaisquer outros ensaios ou indicadores que o usuário/laboratório considerar relevante para a performance do teste, desde que relevantes em termos de desempenho analítico e clínico (Quadro 5).

Por fim, para Newman; Maritz (2017) os ensaios de performance que devem ser realizados em procedimentos de validação de testes *in-house*/produtos IVD alterados são: (1) para testes de resultado qualitativo ou semiquantitativo¹²: ensaios de exatidão/acurácia, precisão, sensibilidade, limite de detecção e especificidade analítica; (2) para testes de resultado quantitativo: todos os ensaios mencionados no tópico (1), somados a ensaios de linearidade. Observa-se também que para o autor, os testes mencionados como ensaios de exatidão/acurácia compreendem, tanto a parte de testes analíticos, quanto a parte de testes clínicos para os ensaios de sensibilidade e especificidade clínica (Quadro 5).

Em relação ao quantitativo de amostras indicado para realização dos ensaios de performance (Quadro 6), Rabenau et al. (2007) recomenda em caso de testes qualitativos: (1) 9 amostras para ensaios de exatidão/acurácia; (2) 10 amostras positivas e 10 amostras positivas baixas para ensaios de sensibilidade; (3) 20 amostras negativas, potencialmente reativas, para ensaios de especificidade; (4) 2 amostras positivas em triplicata para ensaios de precisão intra-ensaio; (5) 2 amostras positivas em simplicata, testadas em 3 dias distintos, para ensaios de precisão inter-ensaio. E, em caso de testes quantitativos: (1) 9 amostras para ensaios de exatidão/acurácia; (2) 10 amostras positivas e 10 amostras positivas baixas para ensaios de sensibilidade; (3) 20 amostras negativas, potencialmente reativas, para ensaios de especificidade; (4) 9 amostras positivas em triplicata para ensaios de precisão intra-ensaio; (5) 3 amostras positivas em simplicata, testadas em 3 dias distintos, para ensaios de precisão inter-ensaio; (6) 4 diluições seriadas em duplicata testadas em 2 dias distintos, para ensaios de intervalo de medição/linearidade (Quadro 6).

¹¹O termo “semiquantitativo” é definido pelos autores como testes onde dados quantitativos estão disponíveis e um *threshold* é definido para determinar a positividade.

¹²O termo “semiquantitativo” é definido pelo autor como teste relatado de maneira qualitativa, mas que apresenta dados brutos quantitativos que podem ser avaliados.

Jennings; Van Deerlin; Gulley (2009), não definem um número específico, já que para os autores esta definição é dependente de uma série de fatores como: finalidade, precisão, complexidade do teste, intervalos de confiança, resultados esperados etc. Neste caso, os autores recomendam a consulta das diretrizes do CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*), consideradas referência no âmbito americano, para busca de protocolos que forneçam estimativas em relação ao número de amostras e dias de avaliação considerados ideais para obtenção de dados estatisticamente significativos, além de algumas ferramentas de estatística disponíveis online.

E por fim, Newman; Maritz (2017) indica em caso de testes qualitativos: (1) 20 amostras positivas e 20 amostras negativas para ensaios de exatidão/acurácia; (2) 5 amostras positivas de concentrações distintas em 3-10 replicatas para ensaios de sensibilidade/LOD; (3) 2 amostras positivas e 2 amostras negativas para ensaios de precisão intra-ensaio; (4) 2 amostras positivas e 2 amostras negativas, testadas em 5 dias distintos, para ensaios de precisão inter-ensaio. Em caso de testes semiquantitativos: (1) 20 amostras positivas e 20 amostras negativas para ensaios de exatidão/acurácia; (2) 5 amostras positivas de concentrações distintas em 3-10 replicatas para ensaios de sensibilidade/LOD (3) 2 amostras positivas em triplicata para ensaios de precisão intra-ensaio; (4) 2 amostras positivas em triplicata, testadas por 3-5 dias distintos, para ensaios de precisão inter-ensaio; (5) 4 diluições de duas amostras distintas em duplicata testadas por 2 dias distintos, para ensaios de linearidade. E, em caso de testes quantitativos: (1) 20 amostras positivas e 20 amostras negativas para ensaios de exatidão/acurácia; (2) 5 amostras positivas de concentrações distintas em 3-10 replicatas para ensaios de sensibilidade/LOD; (3) 6 amostras positivas em triplicata para ensaios de precisão intra-ensaio; (4) 6 amostras positivas em triplicata, testadas por 3-5 dias distintos, para ensaios de precisão inter-ensaio; (5) 4 diluições de duas amostras distintas em duplicata testadas por 2 dias distintos, para ensaios de linearidade (Quadro 6).

Portanto, considerando todos os pontos previamente abordados, conclui-se que apesar de existirem inúmeros materiais e *guidelines* disponíveis para consulta, raramente estes veículos concordam entre si sobre a maneira ideal de validar ou verificar um teste de diagnóstico, além de não haver um consenso sobre a melhor análise estatística a ser realizada para diferentes testes, ressaltando a necessidade de padronização no meio mencionada anteriormente.

Deste modo, até que seja estabelecida uma diretriz universal ou normativa padrão, que contenha a descrição detalhada dos ensaios de performance necessários para validação de testes moleculares. Para a definição do *layout* de validação de qualquer pesquisa, é importante que as análises sejam realizadas de modo multiparamétrico, levando em consideração tanto a pesquisa de dados prévia, quanto a identificação das metodologias aplicadas na área de atuação, *guidelines* vigentes e as normas regulatórias vigentes do país.

Quadro 4 – Termos e definições utilizados para ensaios de *performance* para uso IVD.

Título	<i>Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology</i>	<i>CAP Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Tests</i>	Basic overview of method validation in the clinical virology laboratory	Manual para regularização de produtos para diagnóstico <i>in vitro</i> na ANVISA
Referência/Origem	RABENAU et al, 2007 / Alemanha	JENNINGS; VAN DEERLIN; GULLEY, 2009 / Estados Unidos	NEWMAN; MARITZ, 2017 / África do Sul	BRASIL, 2016/ Brasil
Precisão	<i>Level of concordance of the individual test results within a single run (intra-assay precision) and from one run to another (inter-assay precision).</i>	<i>Closeness of agreement between independent test results obtained under stipulated conditions. (ISO³ 3534-1)</i>	<i>How well a given measurement can be reproduced when a test is applied repeatedly to multiple aliquots of a single homogenous sample.</i>	Indica o quanto as medidas repetidas estão próximas umas das outras.
Exatidão/Acurácia	<i>Degree of conformity of a measured or calculated quantity to its actual (true) value and can be estimated by analyses of reference materials. or Comparisons of results with those obtained by a reference method.</i>	<i>Closeness of agreement between a test result and an accepted reference value.</i>	<i>Closeness of agreement between a test result and an accepted reference value or comparative method.</i>	Indica o quão próximo do valor real (valor normalmente aceito como referência) está o valor obtido na medição, ou seja, é a comparação do resultado encontrado pelo método com o resultado tido como verdadeiramente correto.
Sensibilidade Analítica	<i>Proportion of true positives of all positives.</i>	<i>The lowest amount or concentration of an analyte that is detectable by a test, and it is therefore equivalent to LOD.</i>	<i>The ability of an assay to detect very low concentrations of the analyte.</i>	A capacidade de um método analítico obter resultados positivos frente a resultados positivos obtidos pelo método de referência.
Sensibilidade Clínica		<i>The proportion of individuals who have (or will develop) the phenotype of interest and who have a</i>	<i>Probability that a test result will be positive when the disease is present (true positive rate, expressed as</i>	Percentual de resultados positivos obtidos quando o analito está presente na amostra, reconhecendo a

		<i>positive test result.</i>	<i>a percentage).</i>	presença de uma determinada doença ou condição.
Especificidade Analítica	<i>A measure how well a test or test system correctly identifies the proportion of true negatives.</i>	<i>The ability of a test or procedure to correctly identify or quantify an entity in the presence of interfering substances that might be expected to be present. For qualitative or semiquantitative tests, it is the method's ability to obtain negative results in concordance with negative results obtained by the reference method. (CLSI¹) or Equivalent to interfering substances and/or cross-reactivity. (FDA²)</i>	<i>The ability of an assay to detect only the intended target and that quantification of the target is not affected by cross-reactivity from related or potentially interfering organisms or substances.</i>	Capacidade de um método analítico determinar somente o analito frente a outras substâncias presentes na amostra.
Especificidade Clínica		<i>The proportion of subjects who do not have a specified disorder and whose test results are interpreted as negative.</i>	<i>Probability that a test result will be negative when the disease is not present (true negative rate, expressed as a percentage).</i>	Percentual de resultados negativos obtidos quando o analito não está presente na amostra, reconhecendo a ausência de uma determinada doença ou condição.
Limite de Detecção (LOD)	<i>The lowest concentration or quantity of an analyte that can be detected with a stated reasonable uncertainty for a given analytical procedure.</i>	<i>The lowest amount of analyte that is distinguishable from background (a negative control) with a stated level of confidence.</i>	<i>The lowest concentration of analyte that can be consistently detected.</i>	A menor quantidade do analito que pode ser mensurada.
Intervalo de Medição/Linearidade	<i>The determination of the linear range of quantification.</i>	<i>The ability of the test to return values that are directly proportional to the concentration of the</i>	<i>The ability of the test to return values that are directly proportional to the concentration of the</i>	Faixa de medição (sistemas de medição lineares e não lineares). Esta faixa de medição deve incluir o limite

		<i>analyte in the sample.</i>	<i>analyte in the sample.</i>	inferior de quantificação.
Robustez	Não definido.	<i>Test precision given small, deliberate changes in test conditions (e.g., prolonged delays, variations in storage temperature).</i>	Não definido.	Não definido.
Substâncias Interferentes	Não definido.	<i>Any substance that, at a given concentration, causes a systematic error in the analytic result.</i>	Não definido.	Substâncias que interferem na amostra durante a realização do teste. Interferentes são quaisquer substâncias, que possam causar uma alteração no resultado do teste como hemólise, lipemia etc.

¹*Clinical Laboratory Standard Institute*; ²*Food and Drugs Administration*; ³*International Organization for Standardization*; *Standardization*; ⁴*Positive Predictive Value*; ⁵*Negative Predictive Value*.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2016; RABENAU et al., 2007; JENNINGS; VAN DEERLIN; GULLEY, 2009; NEWMAN; MARITZ, 2017.

Quadro 5 – Ensaio de performance recomendados para validação de testes *in-house*/produtos por autor

Título	<i>Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology</i>	<i>CAP Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Tests</i>	Basic overview of method validation in the clinical virology laboratory
Referência/Origem	RABENAU et al, 2007 / Alemanha	JENNINGS; VAN DEERLIN; GULLEY, 2009 / Estados Unidos	NEWMAN; MARITZ, 2017 / África do Sul
Precisão	X	X	X ³
Exatidão/Acurácia	X	A	X ³
Sensibilidade Analítica	X	X ²	X ³
Sensibilidade Clínica		X ²	A
Especificidade Analítica	X	A	X ³
Especificidade Clínica		X ²	A
Limite de Detecção (LOD)	ND	X ²	X ³
Intervalo de Medição/Linearidade	X ¹	X ²	X ¹
Robustez	ND	X	ND
Substâncias Interferentes	M	A	ND

¹Apenas para ensaios quantitativos; ²Para ensaios semiquantitativos e quantitativos; ³Para ensaios qualitativos e semiquantitativos; ND: não definido pelo autor; M: necessário para ensaios de validação em diferentes matrizes; A: ensaio abordado em outro tópico.

Fonte: Adaptado de RABENAU et al., 2007; JENNINGS; VAN DEERLIN; GULLEY, 2009; NEWMAN; MARITZ, 2017.

Quadro 6 – Quantitativo de amostras recomendados para validação de testes *in-house*/produtos IVD alterados

Referência/Origem	RABENAU et al., 2007/ Alemanha		NEWMAN; MARITZ, 2017/ África do Sul		
	Qualitativo	Quantitativo	Qualitativo	Semiquantitativo	Quantitativo
Precisão Intra-Ensaio/ Repetibilidade	1 positiva + 1 Positiva baixa em triplicata. ¹	6 positivas + 3 Positivas baixas em triplicata. ¹	2 positivas + 2 negativas.	1 positiva + 1 positiva baixa em triplicata.	3 positivas + 3 positivas baixas em triplicata.
Precisão Inter-Ensaio/ Reprodutibilidade	1 positiva + 1 positiva baixa em simplicata, por 3 dias distintos. ¹	2 positivas + 1 baixa positiva em simplicata, por 3 dias distintos. ¹	2 positivas + 2 negativas, por 5 dias.	1 positiva + 1 positiva baixa em triplicata, por 3-5 dias distintos.	3 positivas + 3 positivas baixas em triplicata, por 3-5 dias distintos.
Exatidão/Acurácia	3 positivas + 3 positivas baixas + 3 negativas.		10 positivas + 10 positivas baixas + 20 negativas. ³ ou 1/3 positivas altas, 1/3 positivas, 1/3 positivas baixas. ³		
Sensibilidade Analítica	10 positivas + 10 positivas baixas.		Obtida através do ensaio de LOD.		
Sensibilidade Clínica			Obtida através do ensaio de Exatidão/Acurácia.		
Especificidade Analítica	20 negativas.		Não definido pelo autor.		
Especificidade Clínica			Obtida através do ensaio de Exatidão/Acurácia.		
Limite de Detecção (LOD)	Não definido pelo autor.		5 concentrações distintas próximas ao LOD esperado, em 3-10 replicatas para cada concentração. ²		
Intervalo de Medição/Linearidade	Não realizado pelo autor para este tipo de teste.	4 diluições seriadas em duplicata, 2 dias distintos	Não realizado.	4 diluições de duas amostras distintas, em duplicata por 2 dias distintos.	
Robustez	Não definido pelo autor.		Não definido pelo autor.		
Substâncias Interferentes	Não definido pelo autor.		Não definido pelo autor.		

Fonte: Adaptado de RABENAU et al., 2007; JENNINGS; VAN DEERLIN; GULLEY, 2009; NEWMAN; MARITZ, 2017.

Notas:

¹Os ensaios de precisão geralmente são caracterizados em termos do desvio padrão das medições e desvio padrão relativo (coeficiente de variação).

²O LOD é geralmente fixado em 95%, o que indica que pelo menos em 95% das vezes, a concentração especificada pode ser diferenciada de uma amostra negativa.

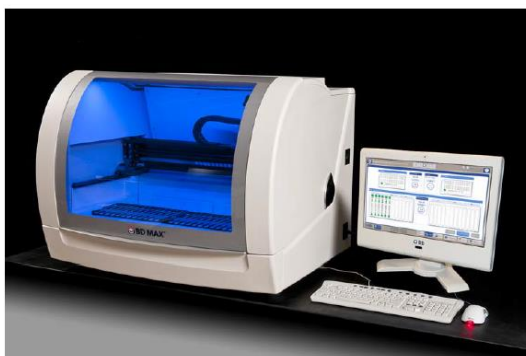
³Os laboratórios podem optar por testar as amostras em duplicata, de modo que os dados gerados representem amostras bem caracterizadas. No entanto, se é esperado um acordo próximo, como geralmente é o caso de produtos IVD, as amostras podem ser testadas individualmente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PLATAFORMA TOTALMENTE AUTOMATIZADA BD MAX™ SYSTEM

O BD MAX™ System é uma plataforma totalmente automatizada para extração, amplificação e detecção de ácidos nucleicos a partir de amostras processadas de vários tipos de espécimes (Figura 1).

Figura 1 - Plataforma totalmente automatizada BD MAX™ System

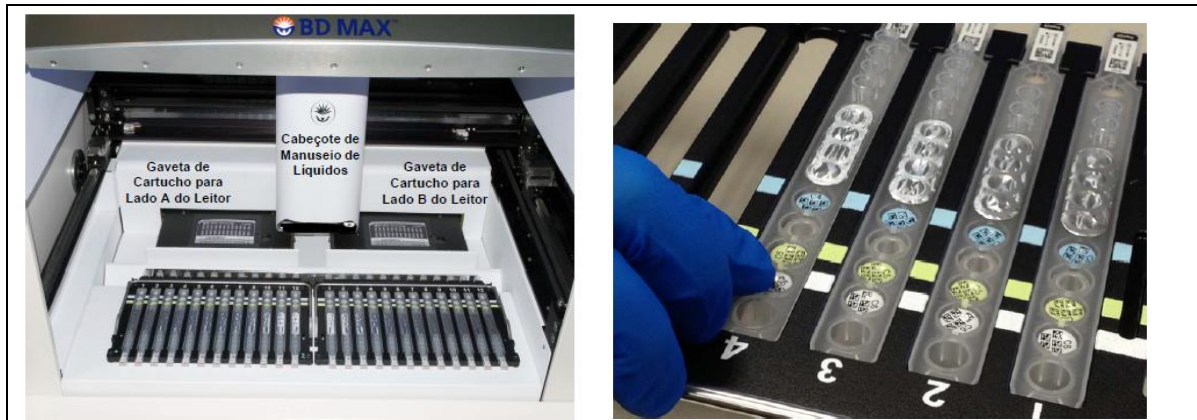


Fonte: Manual do Usuário BD MAX™ System (BECTON DICKINSON AND COMPANY, 2016)

Até dois racks de 12 amostras podem ser carregados no instrumento por execução, proporcionando uma faixa de trabalho de 1 a 24 amostras. O tempo total de manuseio requerido ao usuário, considerando vórtex das amostras, troca de tampas, carregamento no sistema, manutenção e inicialização do instrumento, é de aproximadamente 15 minutos para uma execução de 24 amostras.

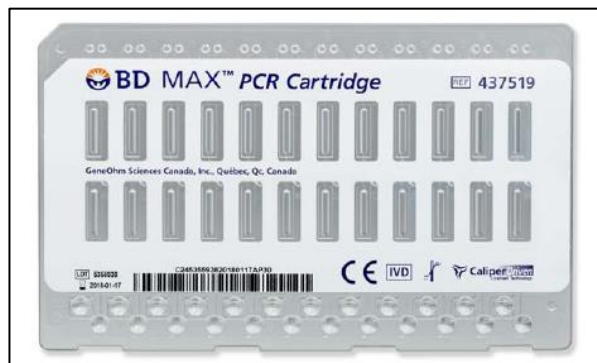
Sua estrutura consiste em um cabeçote de manuseio de líquidos, montado em uma armação robótica que permite a realização dos processos de extração por meio de uma série de etapas associadas em uma tira de reagente unitizada para cada amostra testada (Figura 2). Já os processos de amplificação e detecção em tempo real ocorrem por meio de tecnologia microfluídica, realizada no cartucho de PCR BD MAX™ para a detecção de sequências alvo de ácido nucleico (Figura 3).

Figura 2 - Cabeçote de manuseio de líquidos + Tira de reagentes



Fonte: Manual do Usuário BD MAX™ System (Becton Dickinson and Company, 2016)

Figura 3 – Cartucho de PCR BD MAX™



Fonte: Manual do Usuário BD MAX™ System (BECTON DICKINSON AND COMPANY, 2016)

Em relação ao processo, resumidamente, após o processo de extração, o ácido nucleico purificado é combinado com a master mix designada para o teste, em que o instrumento transfere toda a reação para a posição destinada à injeção de amostras no cartucho e carregamento da reação de PCR. Após esta etapa, a gaveta que contém o cartucho de PCR BD MAX™ é inserida em uma unidade de leitura, em que a amplificação e a detecção automatizadas de PCR são realizadas.

Cada unidade de leitura é composta por quatro subsistemas principais: o sistema de pressão, o sistema de alinhamento de cartuchos, o sistema térmico e o sistema do leitor óptico. Os sistemas de pressão e alinhamento de cartuchos utilizam microválvulas para garantir a ausência de perdas de reagentes, evaporação e/ou exposição limitada a contaminantes em potencial. O sistema térmico integrado é responsável por todo o ciclo térmico necessário para a execução do processo de amplificação em tempo real. E por fim, o sistema de leitura óptica é responsável pela leitura/detecção individual de cada coluna do cartucho de amplificação, a cada ciclo

de PCR, para posterior interpretação de resultados pelo *software* do BD MAX™ System.

Além disso, no BD MAX™ System cada leitor integrado possui um sistema de leitura óptica composto por cinco canais de fluorescência. Durante o processo de amplificação, a luz gerada pela excitação dos fluoróforos contidos na reação de PCR é direcionada para a câmara de PCR, assim o sinal fluorescente oriundo de cada coluna do cartucho é lido pelo *software* da plataforma e interpretado automaticamente para geração dos resultados (Figura 4).

Figura 4 – Canais de fluorescência disponíveis no BD MAX™ System

Comprimento de Onda	Exemplos
475/520	FAM
530/565	VIC
585/630	Cal Red/ROX
630/665	Cy5
680/715	Cy5.5

Fonte: Manual do Usuário BD MAX™ System (BECTON DICKINSON AND COMPANY, 2016)

4.2 PAINEL MOLECULAR MULTIPLEX XGEN MULTI MB

O Kit XGEN MULTI MB é um teste de PCR em tempo real que atua como auxílio ao diagnóstico de infecções por meningites bacterianas através da detecção qualitativa dos ácidos nucleicos de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* em amostras de líquido cefalorraquidiano e sangue total.

Sua metodologia é baseada na atividade de exonuclease 5' da polimerase, que, durante a amplificação do DNA, cliva a sonda ligada à sua sequência complementar, separando o corante quencher do repórter. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente que é proporcional à quantidade do alvo de detecção, podendo ser medida em plataformas da PCR em tempo real. No caso do kit XGEN MULTI MB, o DNA bacteriano contido nas amostras testadas é amplificado simultaneamente por meio da reação em cadeia da polimerase que, devido a

sequências específicas para cada patógeno contido no kit, detecta o aumento da fluorescência das sondas correspondentes e interpreta, por meio de um termociclador em tempo real, os valores correspondentes de Ct (*Cycle threshold*).

O kit deve ser utilizado somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado. O pessoal técnico deve ser profundamente treinado no uso dos termocicladores em tempo real, na manipulação de reagentes de biologia molecular e protocolos de amplificação de PCR em Tempo Real.

O formato padrão do kit contém reagentes para 24 ou 48 testes (Figura 5), sendo que seus componentes devem ser transportados e armazenados na embalagem original à temperatura de 2°C a 40°C, o que possibilita que o produto seja estável até a data de vencimento indicada no rótulo, desde que armazenado corretamente.

Após a reconstituição, é recomendado o armazenamento dos componentes Controle Positivo (CP MB) e Controle Interno (CI MB) a -20°C, e, para a master mix (MIX MB), o armazenamento a 2 a 8°C, para um período de até 4 horas, e de -20°C para longos períodos. Também é recomendado separar os componentes em alíquotas para minimizar os ciclos de descongelamento/congelamento, sendo os componentes estáveis por até 6 ciclos de descongelamento/congelamento.

Figura 5 – Composição Kit XGEN MULTI MB

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE 24 TESTES XG-MB-MB-24	QUANTIDADE 48 TESTES XG-MB-MB-48
MIX MB	Mistura de Enzimas, sondas, <i>primers</i> , tampão, dNTPs e controle interno em formato estabilizado para detecção de HI, NM e SPN	1 frasco	2 frascos
TR	Tampão de Reidratação	1 frasco x 1,8 mL	1 frasco x 1,8 mL
CI	Controle Interno	1 frasco	1 frasco
CP MB	Controle Positivo contendo DNA sintético liofilizado	1 frasco	1 frasco
CN	Controle Negativo	1 frasco x 1 mL	1 frasco x 1 mL
H2O	Água livre de RNase/DNase	1 frasco x 1 mL	1 frasco x 1 mL

*Cada frasco contém um volume adicional para imprecisão de pipetagem.

Fonte: Instrução de uso kit XGEN MULTI MB (MOBIUS LIFE SCIENCE, 2020).

Cada componente da MIX MB emite uma fluorescência específica detectada por canais distintos (Figura 6). Após a configuração de *threshold* e *baseline*, é obrigatório validar cada sessão de amplificação por meio da análise das reações de Controle Negativo e Controle Positivo, conforme figura 7.

Figura 6 – Seleção de detectores Kit XGEN MULTI MB

	Patógeno	Reporter
MIX MB	<i>Haemophilus influenzae</i>	FAM
	CI	VIC
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ROX
	<i>Neisseria meningitidis</i>	CY5

Fonte: Instrução de uso kit XGEN MULTI MB (MOBIUS LIFE SCIENCE, 2020).

Figura 7 – Validação da Corrida

Critério	Alvos	Controle Interno	Resultado do Ensaio
Controle Negativo	Ct Indeterminado/Não detectado	Ct Determinado/Detectado	Válido
	Ct Determinado/Detectado ⁽¹⁾	Ct Determinado/Detectado	Inválido
	Ct Indeterminado/Não detectado	Ct Indeterminado/Não detectado ⁽³⁾	Inválido
Controle Positivo	Ct Determinado/Detectado ^(2,4)	Ct Indeterminado/ Não detectado ⁽³⁾	Válido
	Ct Indeterminado/Não detectado ^(2,4)	Ct Indeterminado/ Não detectado ⁽³⁾	Inválido
	Ct Indeterminado/Não detectado ^(2,4)	Ct Determinado/Detectado	Inválido

NOTA:

¹ O controle negativo deve ficar abaixo do *threshold*. Se existir potencial contaminação (aparecimento de curva de amplificação no controle negativo ou conjunto de curvas em amostras com alto Ct), os resultados obtidos não são interpretáveis e toda a corrida (incluindo extração) deve ser repetida.

² Todos Controles Positivos devem exibir um traço positivo (exponencial) de amplificação.

³ Todos os Controles Internos devem apresentar traço positivo (exponencial) de amplificação.

⁴ As sondas possuem diferentes níveis de fluorescência, por isso as curvas para diferentes alvos apresentam aspectos diferentes.

Fonte: Instrução de uso kit XGEN MULTI MB (MOBIUS LIFE SCIENCE, 2020).

Além disso, para interpretação dos resultados, o usuário deve realizar uma análise cuidadosa dos gráficos obtidos para cada amostra e para todos os alvos, confirmando assim a presença ou ausência do traço exponencial (Figura 8).

Figura 8 – Análise das Amostra Clínicas

Critério	Alvos	Controle Interno	Resultado
Amostra	Ct < 40 ⁽¹⁾	Ct Determinado/Detectado	Amostra Positiva Válida
	Ct ≥ 40 ou Indeterminado/Não detectado	Ct Determinado/Detectado	Amostra Negativa Válida ⁽³⁾
	Ct < 40 ⁽¹⁾	Ct Indeterminado/Não detectado ⁽²⁾	Amostra Positiva Válida
	Ct ≥ 40 ou Indeterminado/Não detectado	Ct Indeterminado/Não detectado ⁽²⁾	Amostra Inválida

NOTA:

¹ As sondas possuem diferentes níveis de fluorescência, por isso as curvas para diferentes alvos apresentam aspectos diferentes.

² Todos os Controles Internos devem apresentar traço positivo (exponencial) de amplificação. Caso não haja amplificação do Controle Interno pode haver problemas de purificação ou amostra fortemente positiva. É recomendado repetir o ensaio diluindo a amostra 1:10 ou repetir a extração para checar por possíveis problemas de inibição.

³ O resultado negativo pode ser devido à ausência do alvo na amostra ou a presença de uma quantidade de cópias abaixo do limite de detecção do kit.

Fonte: Instrução de uso kit XGEN MULTI MB (MOBIUS LIFE SCIENCE, 2020).

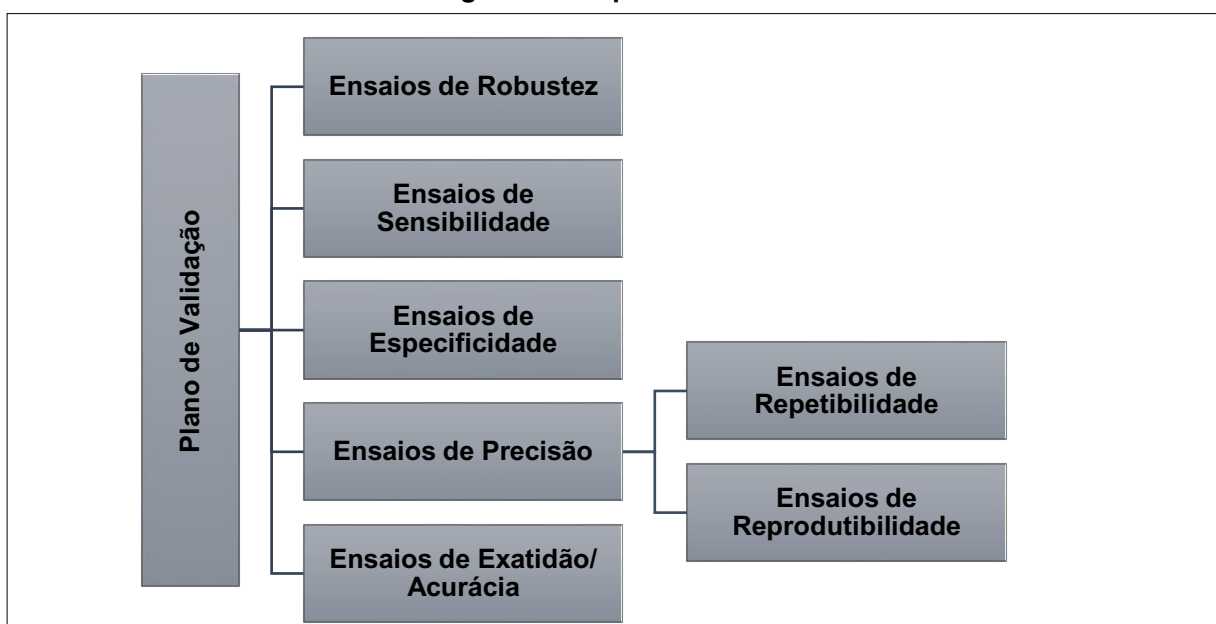
4.3 VALIDAÇÃO DE SISTEMA SINDRÔMICO MULTIPLEX PARA DIAGNÓSTICO DE MENINGITES BACTERIANAS (SSM MB)

Os ensaios de performance para validação do Sistema Síndrômico Multiplex para diagnóstico de meningites bacterianas (SSM MB), composto pela plataforma totalmente automatizada BD Max™ System (Beckton Dickinson Company, Estados Unidos, Registro ANVISA: 10033430638) em conjunto com o painel molecular multiplex XGEN MULTI MB (Mobius Life Science, Brasil, Registro ANVISA: 80502070038), denominados ao longo do trabalho como SSM MB, foram conduzidos entre Janeiro de 2020 e Outubro de 2020.

Por se tratar da validação de um sistema em que tanto a plataforma totalmente automatizada quanto o painel molecular multiplex possuem registro na ANVISA, o *layout* de testes de validação foi estabelecido seguindo os requisitos necessários para validação de ensaios de performance para produtos IVD alterados (verificar tópico 3.5).

Em relação aos ensaios de performance realizados, foram definidas seis etapas de testes (Figura 9), contemplando um total de 162 ensaios, conforme descrito no plano de validação no Quadro 7. Esta definição foi baseada a partir dos dados obtidos durante o levantamento bibliográfico e também considerando as recomendações dos autores: RABENAU et al., 2007; JENNINGS; VAN DEERLIN; GULLEY, 2009; NEWMAN; MARITZ, 2017 e BRASIL, 2016.

Figura 9 – Etapas de Testes



Fonte: Próprio autor.

Quadro 7 – Plano de validação do Sistema Sindrômico Multiplex SSM MB.

Ensaio de Performance	Descrição do Ensaio	Nº de ensaios
Robustez	Avaliação dos controles positivos em diferentes condições de ganho + Ensaios com amostras de concentração conhecida para cada patógeno contido no Kit XGEN MULTI MB.	10
Sensibilidade Analítica – LOD	Diluição seriada até a ausência de detecção, utilizando 6 pontos de diluição em 4 replicatas para cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB.	72
Especificidade Analítica – “Cross- Reactivity”	Avaliação dos dados obtidos nos ensaios de sensibilidade analítica em relação à capacidade de detecção apenas do patógeno alvo em seu canal específico (Reação Cruzada) + Ensaios de compensação de cor para correção dos sinais de fluorescência interferentes/invasão entre canais ópticos obtidos.	18
Precisão – Ensaios de Repetibilidade	Avaliação dos dados obtidos nos ensaios de sensibilidade analítica em relação as 4 replicatas dos pontos de diluição testados para cada patógeno contido no Kit XGEN MULTI MB + Teste de 4 replicatas de um <i>pool</i> contendo os três patógenos.	4
Precisão – Ensaios de Reprodutibilidade	Teste de 2 replicatas de uma amostra positiva baixa (LOD) + 2 replicatas de uma amostra positiva média/alta (P3) em 3 corridas distintas, para cada patógeno contido no Kit XGEN MULTI MB.	36
Exatidão/ Acurácia	Comparativo inter-equipamentos (plataforma BD Max™ System x QuantStudio™ 5) composto por teste de 1 amostra negativa para todos os patógenos contidos no kit XGEN MULTI MB + 1 amostra positiva alta (ponto P2 em simplicata) + 1 amostra positiva baixa (ponto P4 em simplicata) + 1 amostra positiva baixa no LOD (ponto P5 em duplicata) + 1 um <i>pool</i> contendo os três patógenos na concentração do ponto P3 em duplicata.	22
Total		162

Fonte: Próprio autor.

O processo de validação foi realizado a partir de amostras previamente conhecidas como negativas para os patógenos em análise em conjunto com padrões sintéticos de concentração conhecida, específicos para detecção dos alvos detectados no painel molecular multiplex XGEN MULTI MB (Quadro 8).

Quadro 8 – Padrões Sintéticos

Padrão Sintético	Ref. Modelo	Marca	Concentração	Lote	Validade
AmpliRun® <i>Neisseria meningitidis</i>	MBC036	Vircell, Espanha	13.000 cópias/μL	19MBC036001-C	02/2022
AmpliRun® <i>Haemophilus influenzae</i>	MBC020	Vircell, Espanha	20.000 cópias/μL	18MBC020001	10/2020
AmpliRun® <i>Streptococcus pneumoniae</i>	MBC070	Vircell, Espanha	17.000 cópias/μL	18MBC070001-C	01/2021

Fonte: Próprio autor.

Em relação às configurações do sistema, primeiramente foi criado um protocolo personalizado dentro da plataforma totalmente automatizada BD MAX™ System específico para seu uso em conjunto com o painel molecular multiplex XGEN MULTI MB, chamado de “XGEN BDMAX MB LYO”.

Dentre as configurações foi selecionado: a) para o campo *Extraction Type*, o tipo “ExK DNA-1 (Plasma/Serum) [4-Snap]”; b) para o campo *Master Mix Format*, o formato “Dual Master Mix: MM with Primers and Probes (Type 3)”; c) para a janela de cálculo de Ct, foi utilizado o parâmetro “Call CT at Threshold Crossing”¹³ para todos os testes realizados; d) para o protocolo de PCR, foi aplicado uma etapa inicial de 2 minutos a 95°C, tipo *hold*, seguido por uma etapa de ciclo PCR de 10 segundos a 95°C em 45 ciclos e outra etapa de ciclo PCR de 48 segundos a 60°C (fase de coleta de dados) também em 45 ciclos (Quadro 9); e) para o campo de *threshold*, foi

¹³A janela *CT Calculation* (Cálculo de Ct) permite selecionar como o Ct é configurado, sendo possível a escolha entre: (1) *Call CT at Inflection Point*: chamar Ct no ponto de inflexão; (2) *Call CT at Threshold Crossing*: chamar Ct no cruzamento do *threshold* (configuração padrão); e (3) *Call CT at Threshold Crossing with Secondary Threshold*: chamar Ct no cruzamento do *threshold* com *threshold* secundário.

definido o valor de 100 como parâmetro inicial.¹⁴; f) para os parâmetros de ganho¹⁵ e compensação de cores¹⁶, foram utilizados os valores que apresentaram os melhores resultados nos ensaios de robustez e especificidade (Tópicos 4.3.1 e 4.3.3, respectivamente).

Quadro 9 - Protocolo de PCR personalizado para XGEN MULTI MB na plataforma BD MAX™ System

Etapa	Temperatura	Tempo	# de Ciclos
Hold	95°C	2 min.	1
Ciclo PCR	95°C	10 seg.	45
	60°C (*)	48 segs.	

(*) Coleta de dados.

Fonte: Próprio autor.

O processo de preparação das amostras foi realizado seguindo o protocolo indicado nas instruções de uso do kit de extração BD MAX™ ExK DNA-1 (Ref.: 442818, Fornecedor: Beckton Dickinson Company). O processo de preparação dos reagentes de detecção foi elaborado seguindo o protocolo indicado nas instruções de uso do painel molecular multiplex XGEN MULTI MB (Ref.: XG-MB-MB-24, Fornecedor: Mobius Life Science), sendo necessária a reconstituição dos reagentes liofilizados para início do processo.

Em todos os processos de extração, foi adicionado em cada amostra o controle interno do painel molecular multiplex XGEN MULTI MB (já incluso no kit de detecção), como controle de eficiência de extração. Os resultados que demonstraram ausência de amplificação do controle positivo, amplificação no controle negativo ou ausência de amplificação no controle interno, foram repetidos.

¹⁴Cabe lembrar que, embora a definição de valores de *threshold* seja um parâmetro obrigatório para a geração dos valores de Ct na plataforma BD MAX™ System, a conferência desses valores pelo usuário e ajuste de configuração, quando necessários, também são obrigatórios durante a fase de interpretação de resultados.

¹⁵O campo *Gain* (ganho) é um parâmetro pré-existente na plataforma BD MAX™ System, que permite alterar o nível de energia para cada comprimento de onda, com um realce em uma faixa de 0–100.

¹⁶A janela *Color Compensation* (Compensação de Cores) permite definir valores para a compensação dos sinais de fluorescência que sofreram interferência ou invasão de outros canais ópticos.

5. RESULTADOS

5.1 ENSAIOS DE ROBUSTEZ

Considerando que os ensaios de robustez são definidos, segundo Jennings; Van Deerlin; Gulley (2009), como testes distintos, realizados por meio de pequenas e deliberadas alterações nas condições do teste em validação, para realização dos ensaios de robustez do SSM MB, optou-se por realizar ensaios em diferentes condições de ganho, com o objetivo de avaliar qual dos parâmetros testados apresenta os melhores resultados para detecção dos patógenos *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*.

Para melhor controle de variáveis e menor desperdício de reagentes e amostras, foi utilizado um *layout* de validação por etapas, em que cada ensaio é realizado sob condições controladas e evolui de modo gradual a partir dos objetivos traçados para o teste e resultados obtidos ao final de cada etapa de validação.

Ao final dos ensaios de robustez, os parâmetros definidos foram utilizados para continuidade do processo de validação e realização dos ensaios de sensibilidade analítica, especificidade analítica e precisão.

Etapa 1

Para esta etapa, a fim de evitar o desperdício de amostras e controles sintéticos, optou-se pela realização de ensaios de alteração de ganho utilizando apenas os controles positivos do kit XGEN MULTI MB.

Foi considerado que os ensaios seriam realizados em condições de ganho distintas até a obtenção de resultados considerados adequados para continuidade do processo de validação em conjunto com amostras (Etapa 2).

Portanto, como objetivos desta etapa foram considerados: (1) a verificação inicial do SSM em termos de detecção; (2) a análise dos parâmetros obtidos em relação ao formato da curva de amplificação (exponencial ou não), intensidade de fluorescência e valores de Ct para cada alvo e em cada condição testada; (3) a verificação dos resultados obtidos em relação aos critérios para validação da corrida (conforme instruções de uso do kit XGEN MULTI MB); (4) a eleição do ensaio que apresentou os melhores resultados dentre as condições testadas para continuidade da próxima etapa de validação.

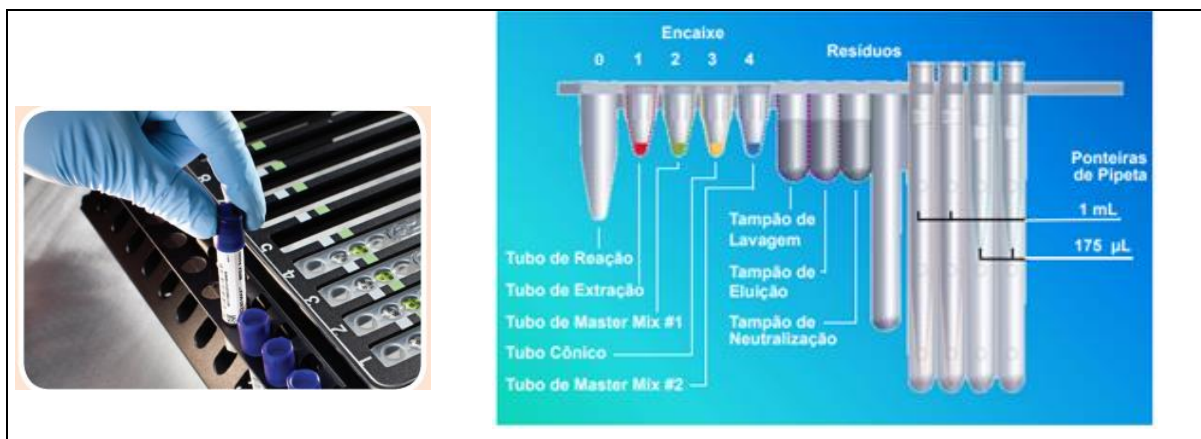
Ensaio #1

O primeiro valor de ganho testado foi o de 60 que é considerado o valor padrão pré-estabelecido da plataforma.

Em relação ao processamento de amostras, resumidamente foram pipetados: 200 μ L de uma mistura contendo 10 μ L de CP MB + 190 μ L de água no tubo de tampão de amostra (SBT)^{17,18}; 25 μ L de água no tubo cônico; e 15 μ L de MIX MB em cada tubo de Master Mix.

Estes tubos, juntamente com o tubo de extração, foram adicionados em suas respectivas posições na tira de extração unitizada DNA-1 e inseridos no rack da plataforma BD MAX™ System para identificação e cadastro das amostras (Figura 10). A partir daí, as etapas de transferência de amostras, extração, amplificação e interpretação dos resultados de amplificação foram realizadas diretamente pela plataforma BD MAX™ System (Figura 11) com posterior análise e validação dos resultados pelo usuário.

Figura 10 – Tubo SBT + Posições da Tira Unitizada

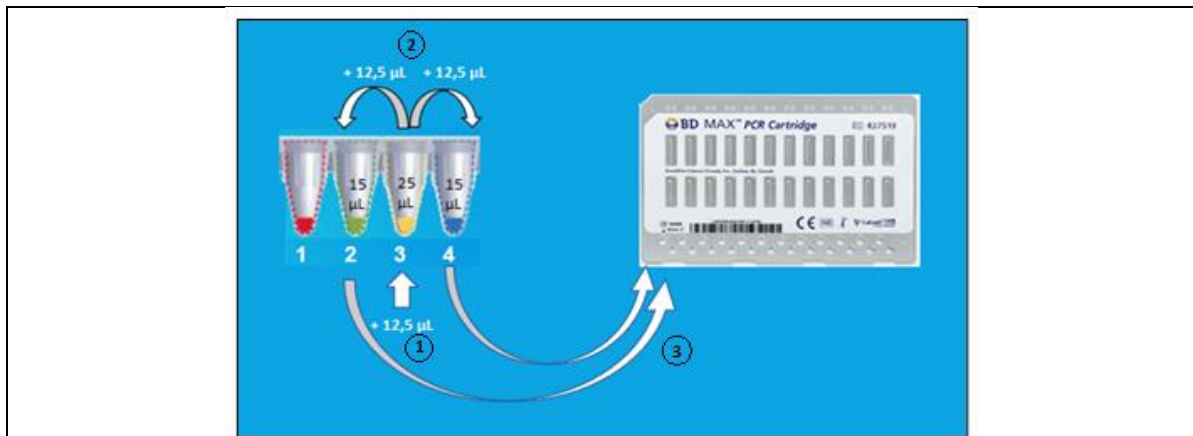


Fonte: Manual do Usuário BD MAX™ System³⁰

¹⁷Foi recomendado pelo fornecedor da plataforma BD MAX™ System que este componente fosse previamente adicionado na fase de extração, no tubo SBT. Assim, o componente realizaria o mesmo processo das amostras de concentração desconhecida e sua performance poderia ser considerada como representativa para validação de ambos os processos de extração e amplificação realizados pela máquina.

¹⁸Em relação ao volume definido, considerando que a plataforma BD MAX™ System exige um volume mínimo de 200 μ L de amostra inicial para uso no tubo SBT e o kit XGEN MULTI MB exige um volume máximo de 10 μ L de CP MB, foi estabelecido que nestes casos será considerado sempre o volume padrão exigido na instrução de uso do kit XGEN MULTI MB e completado o volume restante com água, com o objetivo de atender de ambos os sistemas.

Figura 11 – Etapas Automatizadas plataforma BD MAX™ System



Descrição das Etapas:

- (1) Ao final do processo de extração, o ácido nucléico purificado é eluído em 12,5 µL na posição 3 da tira. Este volume, somado aos 25 µL de água previamente adicionados durante o processo de preparação de amostras, totaliza um volume de 37,5 µL de eluído (amarelo);
- (2) A partir deste volume total de eluído, 12,5 µL são transferidos para cada um dos tubos de Master Mix localizados nas posições 2 e 4 na tira, que também já continha 15 µL de MIX MB previamente adicionados durante o processo de preparação de amostras, totalizando um volume de 27,5 µL de eluído + MIX MB (verde e azul);
- (3) A partir do volume total dos tubos contendo a mistura de eluído + MIX MB (verde e azul) é realizada uma última etapa de transferência para injeção do material no cartucho de PCR BD MAX™ e posterior amplificação através de PCR em tempo real.

Fonte: próprio autor.

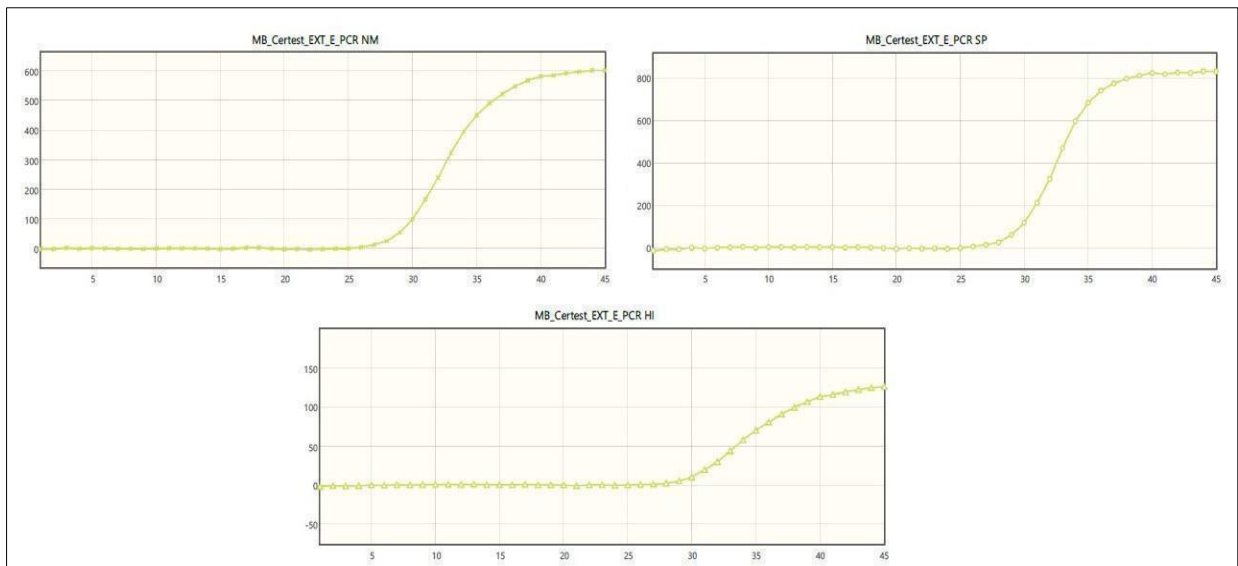
Em relação às análises e validações de resultados realizadas pelo usuário, a partir dos dados obtidos foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência, valores de Ct obtidos (Tabela 1) e de formato da curva (Figura 12) para cada alvo.

Tabela 1 - Valores de Ct e fluorescência - Ganho 60 - Etapa 1

Alvo	Ganho	Ct	Fluorescência
<i>Neisseria meningitidis</i>	60	29,2	600
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	60	29,6	800
<i>Haemophilus influenzae</i>	60	30,2	120

Fonte: Próprio autor.

Figura 12 – Patógenos – Ganho 60 – Etapa 1



Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Para este ensaio, os dados obtidos demonstraram a capacidade da plataforma BD MAX™ System de detectar os controles positivos do kit XGEN MULTI MB com curvas de amplificação em formato exponencial. No entanto, apesar dos resultados de detecção serem considerados válidos e de acordo com as instruções de uso do kit, observou-se que os valores de fluorescência podem ser considerados baixos quando comparados com o padrão que normalmente observamos na rotina.

Assim, optou-se pela realização de um segundo ensaio de ganho, em que fosse aplicado um valor maior que o aplicado no ensaio #1, com o objetivo de aumentar o nível de energia absorvido em cada comprimento de onda pela plataforma BD MAX™ System e realçar as faixas de leitura para obtenção de melhores resultados.

Ensaio #2

Conforme mencionado no ensaio anterior, o segundo valor de ganho testado foi o de 80, que representa um aumento de intensidade de aproximadamente 30% em relação ao ensaio #1.

Em relação ao processamento de amostras, também foram realizadas as mesmas etapas do ensaio #1, ou seja, foram pipetados 200 µL de uma mistura contendo 10 µL de CP MB + 190 µL de água no tubo SBT; 25 µL de água no tubo cônico; e 15 µL de MIX MB em cada tubo de Master Mix.

Estes tubos, juntamente com o tubo de extração, foram adicionados em suas respectivas posições na tira de extração unitizada DNA-1 e inseridos no rack da plataforma BD MAX™ System para identificação e cadastro das amostras (Figura 10). A partir daí, a realização das etapas de transferência de amostras, extração, amplificação e interpretação dos resultados de amplificação foi realizada diretamente pela plataforma BD MAX™ System (Figura 11) com posterior análise e validação dos resultados pelo usuário.

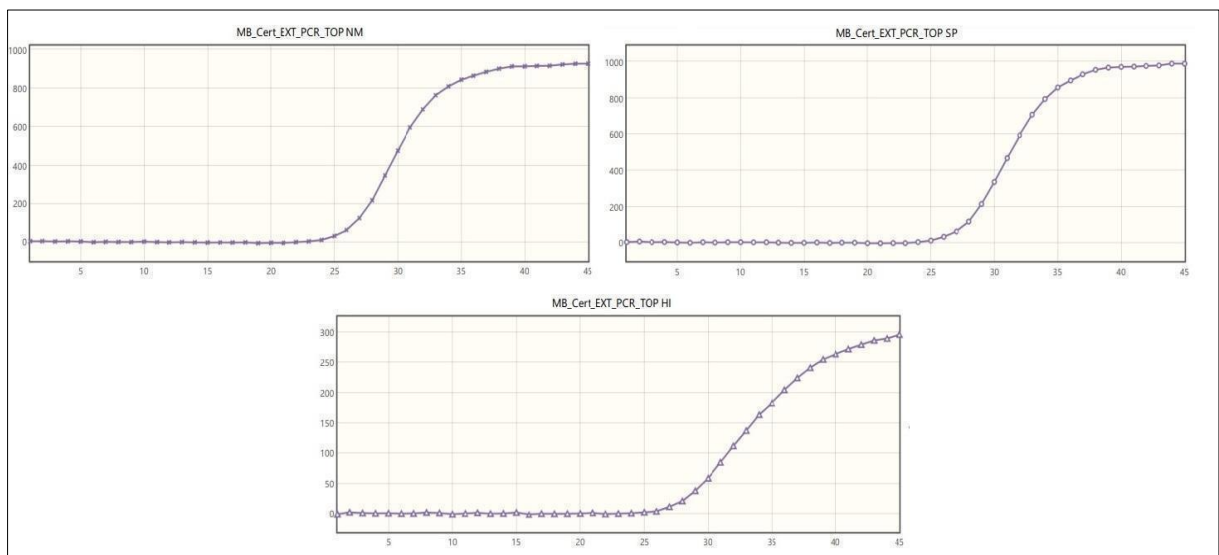
Em relação às análises e validações de resultados realizadas pelo usuário, a partir dos dados obtidos, foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência, valores de Ct obtidos (Tabela 2) e formato da curva (Figura 13) para cada alvo.

Tabela 2 - Valores de Ct e fluorescência - Ganho 80 - Etapa 1

Alvo	Ganho	Ct	Fluorescência
<i>Neisseria meningitidis</i>	80	26,6	900
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	80	27,8	1000
<i>Haemophilus influenzae</i>	80	28,4	300

Fonte: Próprio autor.

Figura 13 – Patógenos – Ganho 80 – Etapa 1

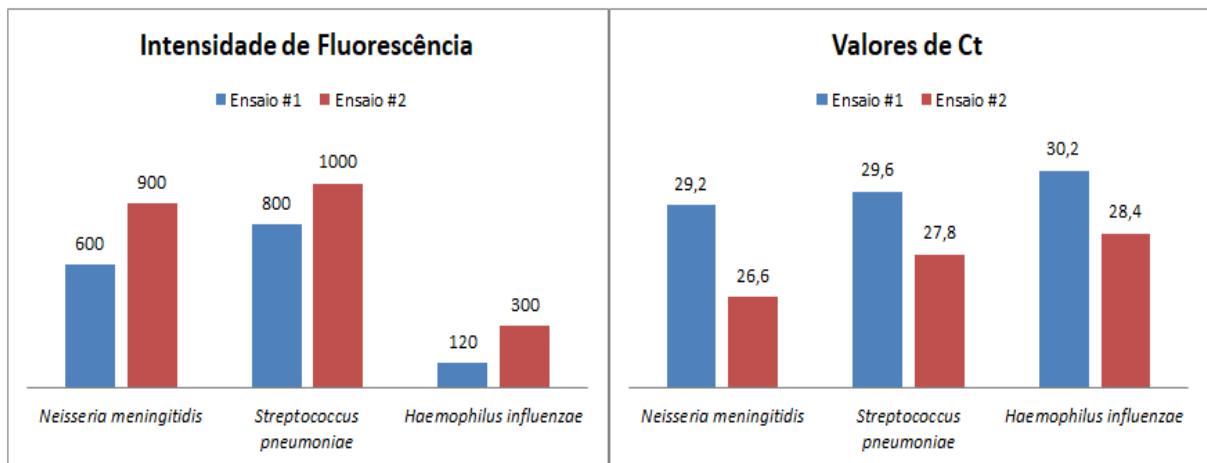


Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Para este ensaio, conforme demonstrado na Figura 14, os dados obtidos demonstraram: (1) para o alvo *Neisseria meningitidis*, um aumento de 50% na

intensidade de fluorescência e uma diminuição de 2,6 no valor de Ct¹⁹; (2) para o alvo *Streptococcus pneumoniae*, um aumento de 25% na intensidade de fluorescência e uma diminuição de 1,8 no valor de Ct; (3) para o alvo *Haemophilus influenzae pneumoniae*, um aumento de 150% na intensidade de fluorescência obtida e uma diminuição de 2,0 no valor de Ct.

Figura 14 – Resultados Ensaio de Robustez – Etapa 1



Fonte: Próprio autor.

Assim, considerando os resultados obtidos e objetivos previamente estabelecidos para o teste, observa-se que os resultados confirmam a capacidade da plataforma BD MAX™ System de detectar os controles positivos do kit XGEN MULTI MB com curvas de amplificação em formato exponencial, resultados de detecção válidos (de acordo com as instruções de uso do kit XGEN MULTI MB) e valores de fluorescência de acordo com o padrão observado na rotina, sem interferência em outros canais.

Dessa forma, elegeu-se o Ensaio #2 como o teste que apresentou os melhores resultados da Etapa 1, sendo o parâmetro eleito para continuidade dos ensaios na Etapa 2.

¹⁹Lembrando que de acordo com os princípios da qPCR os valores de Ct obtidos trabalham em escala inversamente proporcional à concentração do alvo, ou seja, quanto maior a concentração do alvo em análise menor o valor de Ct.

Etapa 2

Para esta etapa, a fim de verificar se os resultados obtidos na Etapa 1 foram mantidos, foram realizados ensaios utilizando os mesmos parâmetros de ganho e condições elegidas na Etapa 1, mas utilizando desta vez amostras previamente conhecidas como negativas em conjunto com padrões sintéticos de concentração conhecida, específicos para detecção dos alvos *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (Quadro 7).

Foi considerado que, em caso de resultados insatisfatórios, os ensaios de ganho deveriam ser novamente realizados em outras condições até a obtenção de resultados considerados adequados para finalização dos ensaios de robustez. Ou seja, retornando novamente para a Etapa 1 para posterior continuidade na segunda etapa.

Portanto, como objetivos desta etapa foram consideradas: (1) a realização dos cálculos de diluição e definição da concentração dos padrões sintéticos que seriam utilizados no ensaio; (2) a análise dos parâmetros obtidos em relação ao formato da curva de amplificação (exponencial ou não), intensidade de fluorescência e valores de Ct para cada alvo e em cada condição testada; (3) a verificação dos resultados obtidos em relação aos critérios para validação da corrida (conforme instruções de uso do kit XGEN MULTI MB); (4) a definição do parâmetro de ganho que será usado como padrão para continuidade do processo de validação.

Ensaio #1

Conforme definido na etapa 1, o valor de ganho aplicado foi 80.

Como processamento inicial e para normalizar a concentração dos padrões sintéticos de todos os alvos, foram realizadas etapas de diluição inicial considerando o uso posterior de 5 µL de material diluído para todos os alvos na extração.

Este volume de material foi estabelecido com o objetivo de obter diluições que ao final do processo resultassem em padrões sintéticos de concentração média, ao final do processo de extração (Tabela 3)²⁰.

²⁰A definição de concentração média foi baseada na informação contida na instrução de uso do kit XGEN MULTI MB, que estabelece um LOD de 10 cópias/reação ou 2 cópias/µL para o material extraído. Deste modo, com objetivo de garantir que o material fosse detectado nesta etapa de testes, optou-se por trabalhar com amostras que ao final do processo de extração apresentassem uma concentração entre 150-300 cópias/µL, que seriam valores considerados médios quando comparados ao LOD.

Tabela 3 - Cálculos de Diluição Inicial e Concentração dos Padrões Sintéticos

Alvo/Título	Vol. de PDS usado	Vol. de amostra usada	[] PDS em Cópias/ μ L	[] PDS Final
	Cálculo aplicado		[] PDS / Vol. Total	[] Padrão x 5
<i>Neisseria meningitidis</i> (13.000 cópias/ μ L)	1 μ L	9 μ L	1.300 cópias/ μ L	6.500 cópias
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (17.000 cópias/ μ L)	1 μ L	9 μ L	1.700 cópias/ μ L	8.500 cópias
<i>Haemophilus influenzae</i> (20.000 cópias/ μ L)	1 μ L	9 μ L	2.000 cópias/ μ L	10.000 cópias

[] Concentração; PDS: Padrão Sintético

Fonte: Próprio autor.

Em relação ao processamento de amostras, resumidamente foram pipetados: 25 μ L de água no tubo cônico; 15 μ L de MIX MB em cada tubo de Master Mix; e 10 μ L de uma mistura contendo 5 μ L de padrão sintético diluído²¹ + 5 μ L de CI MB no tubo de reação.

Estes tubos, juntamente com o tubo de extração, foram adicionados em suas respectivas posições na tira de extração unitizada DNA-1 e inseridos no rack da plataforma BD MAX™ System para identificação e cadastro das amostras (Figura 10). A partir daí, a realização das etapas de transferência de amostras, extração, amplificação e interpretação dos resultados de amplificação foi realizada diretamente pela plataforma BD MAX™ System (Figura 11) com posterior análise e validação dos resultados pelo usuário.

Em relação às análises e validações de resultados realizadas pelo usuário, primeiramente, foi calculado a concentração de cada alvo²², conforme demonstrado na Tabela 4.

²¹Cada patógeno terá um valor de concentração específico, conforme indicado na coluna chamada “[] Final Padrão Sintético” da Tabela 3.

²²Para comparação direta entre os valores obtidos no ensaio proposto e os dados contidos na instrução de uso do Kit XGEN MULTI MB, deve ser utilizada apenas a coluna “[] Eluído em cópias/ μ L”. Os dados referentes às colunas “[] Eluído em cópias/reação” e “[] Eluído + MIX MB em cópias/ μ L” são específicos por tipo de plataforma e não podem ser comparados entre equipamentos/plataformas distintas, uma vez que para os cálculos de concentração são considerados os volumes específicos utilizados pelo SSM em uso.

Tabela 4 – Cálculos de Concentração Esperada Alvos Ensaio #1 – Etapa 2

Alvo/Título	[] Eluído em cópias/ μ L	[] Eluído em cópias/reacção	[] Eluído + Mix MB em cópias/ μ L
Cálculo aplicado	[] Final Padrão Sintético/ 37,5	[] Eluído em cópias/ μ L x 12,5	[] Eluído em cópias/reacção/ 27,5 ¹
<i>Neisseria meningitidis</i>	173,33	2166,63	78,79
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	226,67	2833,38	103,03
<i>Haemophilus influenzae</i>	266,67	3333,33	121,21

[]: Concentração.

¹Dados obtidos a partir da Tabela 4, coluna “[] PDS Final”;

²O volume de 27,5 μ L é obtido da soma de 12,5 μ L Eluído + 15 μ L MIX MB.

Fonte: Próprio autor.

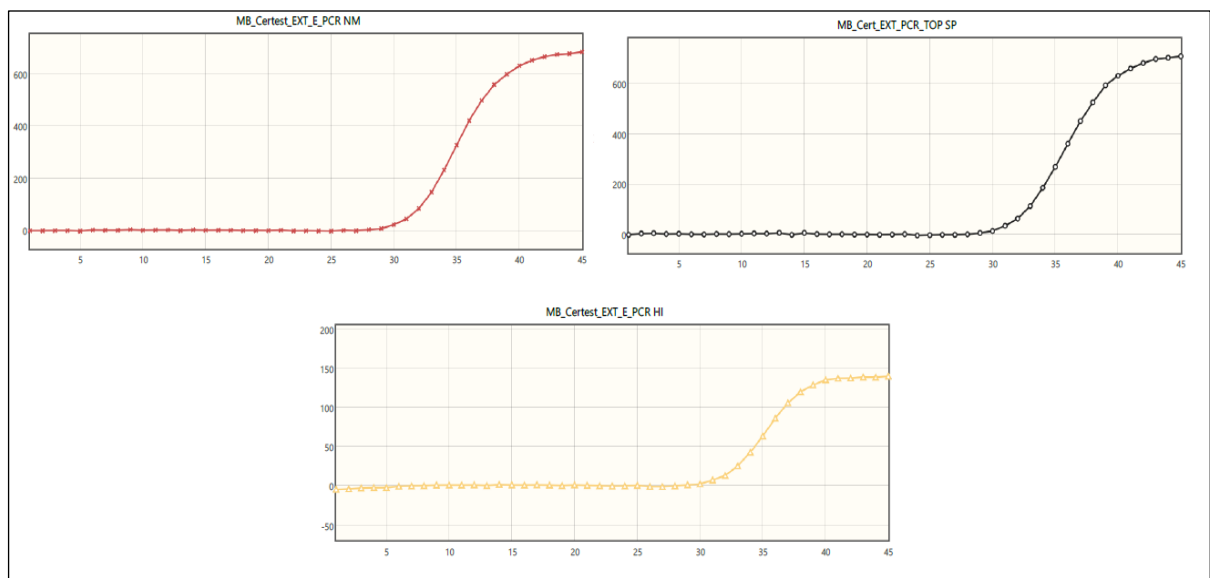
Em seguida, a partir dos dados obtidos foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência, valores de Ct obtidos (Tabela 5) e de formato da curva (Figura 15) para cada alvo.

Tabela 5 - Valores de Ct e fluorescência - Ganho 80 - Etapa 2

Alvo	Ganho	Concentração em cópias/ μ L	Ct	Fluorescência
<i>Neisseria meningitidis</i>	80	78,79	31,80	700
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	80	103,03	32,50	700
<i>Haemophilus influenzae</i>	80	121,21	32,30	140

Fonte: Próprio autor.

Figura 15 – Patógenos – Ganho 80 – Etapa 2



Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Para este ensaio, os dados obtidos demonstraram a capacidade da plataforma BD MAX™ System de detectar amostras clínicas autênticas com curvas de amplificação em formato exponencial, resultados de detecção válidos (de acordo com as instruções de uso do kit XGEN MULTI MB) e valores de fluorescência de acordo com o padrão observado na rotina, sem interferência em outros canais.

Assim, elegeu-se o ganho de 80 como o parâmetro que apresentou os melhores resultados em ambas as etapas, sendo este o parâmetro eleito para continuidade do processo de validação através dos ensaios de Sensibilidade Analítica, Especificidade Analítica e Precisão.

5.2 ENSAIOS DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA – LOD

Considerando que os ensaios de sensibilidade analítica são definidos, segundo BRASIL (2016, p. 73), como “a capacidade de um método analítico de obter resultados positivos frente a resultados positivos obtidos pelo método de referência. A menor quantidade do analito que pode ser mensurada”, para realização dos ensaios de sensibilidade analítica do SSM MB, optou-se por realizar ensaios de diluição seriada (método analítico) com padrões sintéticos de concentração conhecida (método de referência), até a ausência de detecção dos patógenos, com o objetivo de definir qual o limite de detecção do sistema.

Para realização dos ensaios, foram utilizados 6 pontos de diluição em 4 replicatas até o limite de detecção previamente estabelecido para cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB²³.

Em relação às amostras, foram utilizadas amostras previamente conhecidas como negativas em conjunto com padrões sintéticos de concentração conhecida específicos para detecção dos alvos *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (Quadro 7).

Além disso, para melhor controle de variáveis e menor desperdício de reagentes e amostras, os ensaios de sensibilidade analítica foram realizados e analisados por patógeno.

²³O kit XGEN MULTI MB possui um LOD validado pelo fornecedor de 10 cópias/reação ou 2 cópias/μL de material extraído. Estes valores são aplicáveis para uso do kit em conjunto com equipamentos de PCR em tempo real convencionais, sendo necessário à validação e definição de novos valores de LOD quando utilizado em conjunto com outros sistemas.

5.2.1 Ensaios de Sensibilidade Analítica - *Neisseria meningitidis*

Neste ensaio foram realizados os testes de limite de detecção relacionados ao patógeno *Neisseria meningitidis*.

Como processamento inicial e com o objetivo de normalizar a concentração dos padrões sintéticos de todos os alvos, foram realizadas etapas de diluição inicial para obtenção de uma mistura (posteriormente denominada como Mistura PDS, amostra negativa e CI MB) com volume suficiente para realização de todos os ensaios da etapa (4 replicatas por ponto de diluição padrão) considerando um volume de 12,5 µL de material, para cada alvo testado.

Este volume de material foi definido considerando pontos de diluição padrão que, ao final do processo, resultassem em uma concentração aproximada de 17.000 cópias para P1, 10.000 cópias para P2, 5.000 cópias para P3, 1.000 cópias para P4, 500 cópias para P5 e 100 cópias para P6, para posterior processamento na plataforma BD MAX™ System, conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Cálculo dos Pontos de Diluição Padrão para *Neisseria meningitidis*

Alvo/Título	P1	P2	P3	P4	P5	P6
[] PDS Original			13000 cópias/µL			
Vol. de PDS usado			6 µL			
[] obtida para PDS Original¹			78000 cópias			
Vol. de amostra usado para diluição			44 µL			
[] obtida PDS Diluído²			1560 cópias/µL			
Vol. PDS Diluído usado para extração	10,90 µL	6,41 µL	3,21 µL	0,64 µL	0,32 µL	0,06 µL
Vol. de amostra negativa com CI MB usado para extração	1,60 µL	6,09 µL	9,29 µL	11,86 µL	12,18 µL	12,44 µL
Número de réplicas testadas	4	4	4	4	4	6
Volume total da Mistura PDS, amostra negativa e CI MB³	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	75 µL
[] PDS Final em cópias/µL⁴	1360,45	800,46	401,35	80,82	40,91	8,48
[] PDS Final usado para extração⁵	17005,60	10.005,69	5016,89	1010,15	511,38	106,04
	Cópias	cópias	cópias	cópias	cópias	cópias

[] Concentração; PDS: Padrão Sintético

¹Cálculo aplicado: [] PDS Original x Vol. de PDS usado

²Cálculo aplicado: [] PDS obtida para PDS Original / (Vol. de PDS usado + Vol.de amostra usada)

³Cálculo aplicado: (Vol. PDS Diluído usado para extração x Número de réplicas testadas) + (Vol. PDS Diluído usado para extração x Número de réplicas testadas)

⁴Cálculo aplicado: ([] obtida PDS Diluído x Vol. PDS Diluído usado para extração x Número de réplicas testadas) / Volume total da Mistura PDS, amostra negativa e CI MB.

⁵Cálculo aplicado: [] PDS Final em cópias/ μ L x 12,5 μ L

Fonte: Próprio autor.

Em relação ao processamento de amostras, resumidamente foram pipetados: 25 μ L de água no tubo cônico; 15 μ L de MIX MB em cada tubo de Master Mix; e 12,5 μ L da mistura PDS, amostra negativa e CI MB para cada ponto de diluição testado no tubo de reação.

Estes tubos, juntamente com o tubo de extração, foram adicionados em suas respectivas posições na tira de extração unitizada DNA-1 e inseridos no rack da plataforma BD MAX™ System para identificação e cadastro das amostras (Figura 9). A partir daí, a realização das etapas de transferência de amostras, extração, amplificação e interpretação dos resultados de amplificação foi realizada diretamente pela plataforma BD MAX™ System (Figura 10) com posterior análise e validação dos resultados pelo usuário.

Em relação às análises e validações de resultados realizadas pelo usuário, primeiramente, foi calculada a concentração de cada ponto de diluição padrão²⁴, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 – Cálculos de Concentração Esperada - Pontos de Diluição Padrão *Neisseria meningitidis*

Alvo/Título	[] Eluído em cópias/ μ L	[] Eluído em cópias/reação	[] Eluído + Mix MB (cópias/ μ L)
Cálculo aplicado	[] Final Padrão Sintético usado para extração ¹ / 37,5	[] Eluído em cópias/ μ L x 12,5	[] Eluído em cópias/reação/ 27,5 ²
P1	453,44	5668,00	206,11
P2	266,66	3333,20	121,21
P3	133,54	1669,20	60,70
P4	26,98	337,30	12,27
P5	13,31	166,40	6,05
P6	2,50	31,20	1,13

²⁴Para comparação direta entre os valores obtidos no ensaio proposto e os dados contidos na instrução de uso do Kit XGEN MULTI MB deve ser utilizada apenas a coluna “[] Eluído em cópias/ μ L”. Os dados referentes às colunas “[] Eluído em cópias/reação” e “[] Eluído + MIX MB em cópias/ μ L” são específicos por tipo de plataforma e não podem ser comparados entre equipamentos/plataformas distintas, uma vez que, para os cálculos de concentração, são considerados os volumes específicos utilizados pelo SSM em uso.

[]: Concentração.

¹Dados obtidos a partir da Tabela 6, linha “[] PDS Final usado para extração”;

²O volume de 27,5 µL é obtido da soma de 12,5 µL Eluído + 15 µL MIX MB.

Fonte: Próprio autor.

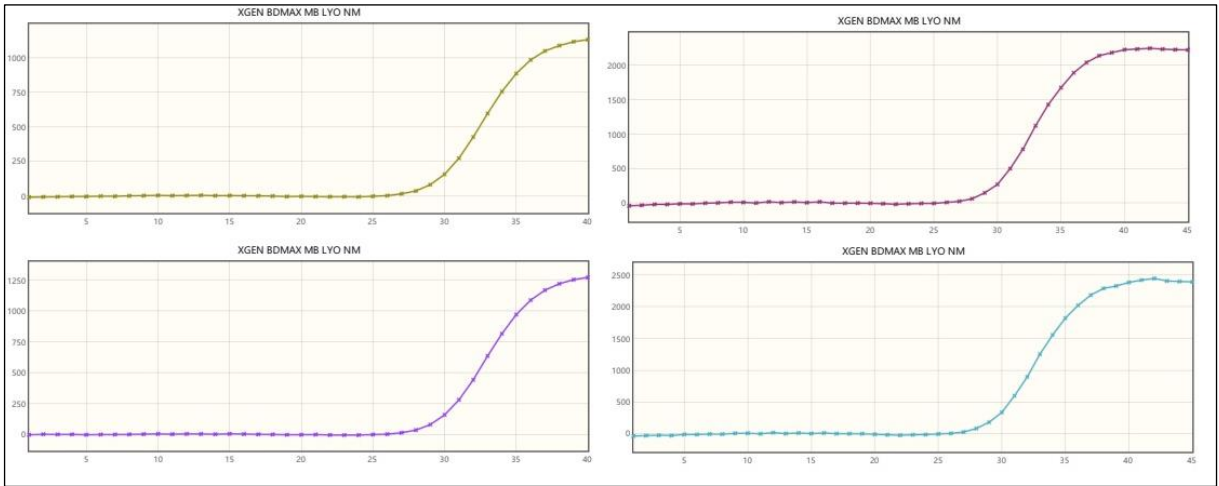
Em seguida, a partir dos dados obtidos, foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência, valores de Ct obtidos (Tabela 8) e de formato da curva (Figuras 16-22) para cada alvo.

Tabela 8 - Valores de Ct e fluorescência – Ensaio de Sensibilidade Analítica – *Neisseria Meningitidis*

Alvo	Ganho	Concentração em cópias/ µL	Ct	Fluorescência
P1 – Replicata 1	80	453,44	28,2	2500
P1 – Replicata 2	80		29,2	1500
P1 – Replicata 3	80		28,5	2300
P1 – Replicata 4	80		29,2	1250
P2 – Replicata 1	80	266,66	30,4	1125
P2 – Replicata 2	80		29,6	1900
P2 – Replicata 3	80		29,9	1200
P2 – Replicata 4	80		29,5	1700
P3 – Replicata 1	80	133,54	31,3	1250
P3 – Replicata 2	80		30,3	1750
P3 – Replicata 3	80		31,5	1000
P3 – Replicata 4	80		30,1	1250
P4 – Replicata 1	80	26,98	33,3	800
P4 – Replicata 2	80		33,1	1750
P4 – Replicata 3	80		34,2	1000
P4 – Replicata 4	80		32,5	2200
P5 – Replicata 1	80	13,31	32,9	1800
P5 – Replicata 2	80		33,3	800
P5 – Replicata 3	80		33,3	2500
P5 – Replicata 4	80		34,3	810
P6 – Replicata 1	80	2,50	Indeterminado	Indeterminado
P6 – Replicata 2	80		35,9	1500
P6 – Replicata 3	80		Indeterminado	Indeterminado
P6 – Replicata 4	80		Indeterminado	Indeterminado

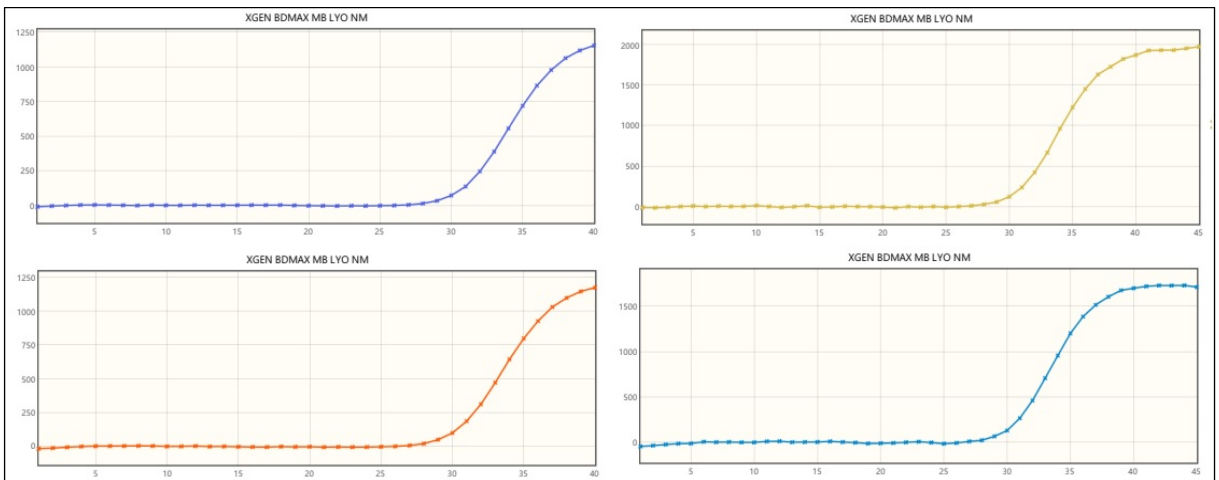
Fonte: Próprio autor.

Figura 16 – Ensaios de Sensibilidade – P1 – *Neisseria meningitidis*



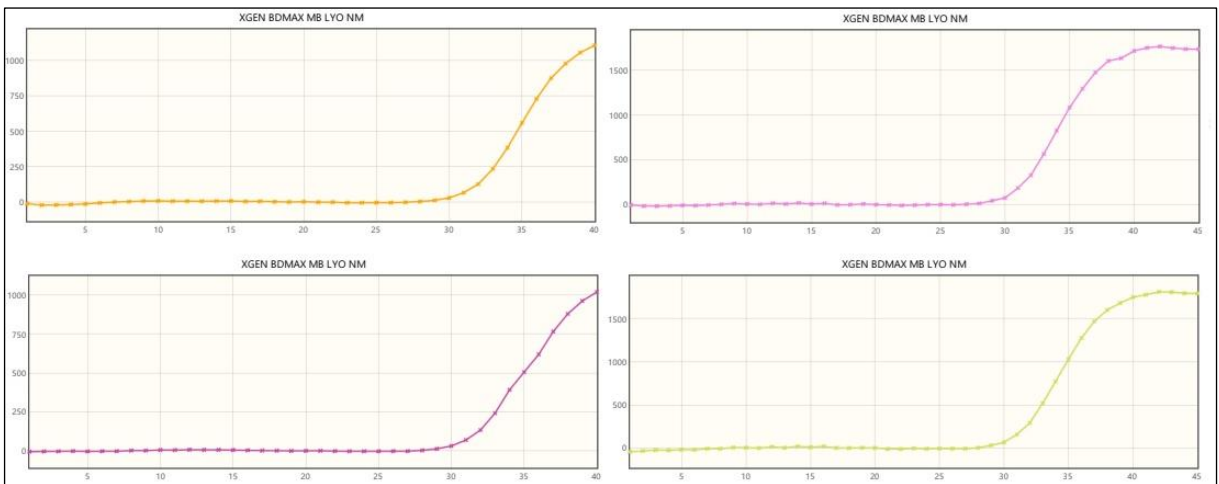
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 17 – Ensaios de Sensibilidade – P2 – *Neisseria meningitidis*



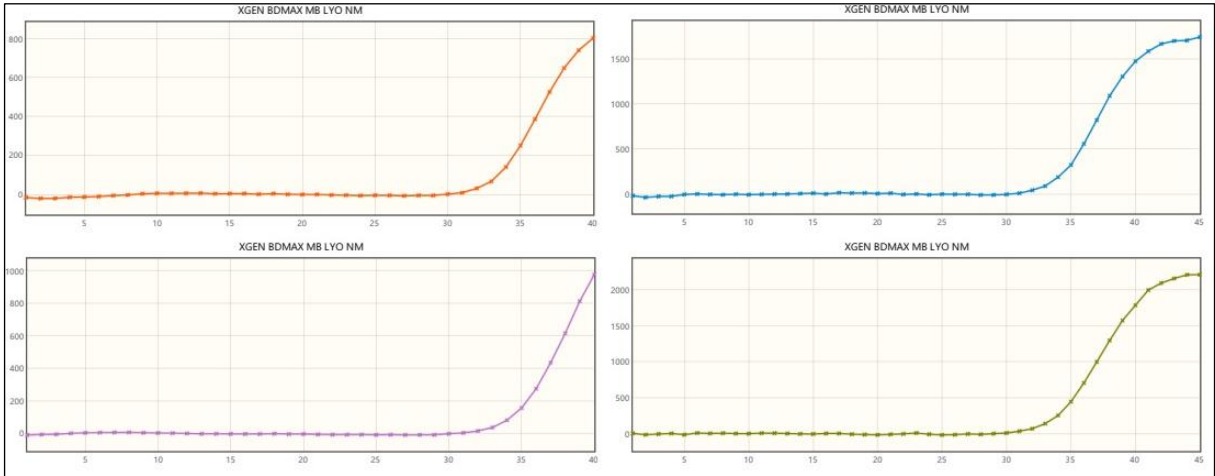
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 18 – Ensaios de Sensibilidade – P3 – *Neisseria meningitidis*



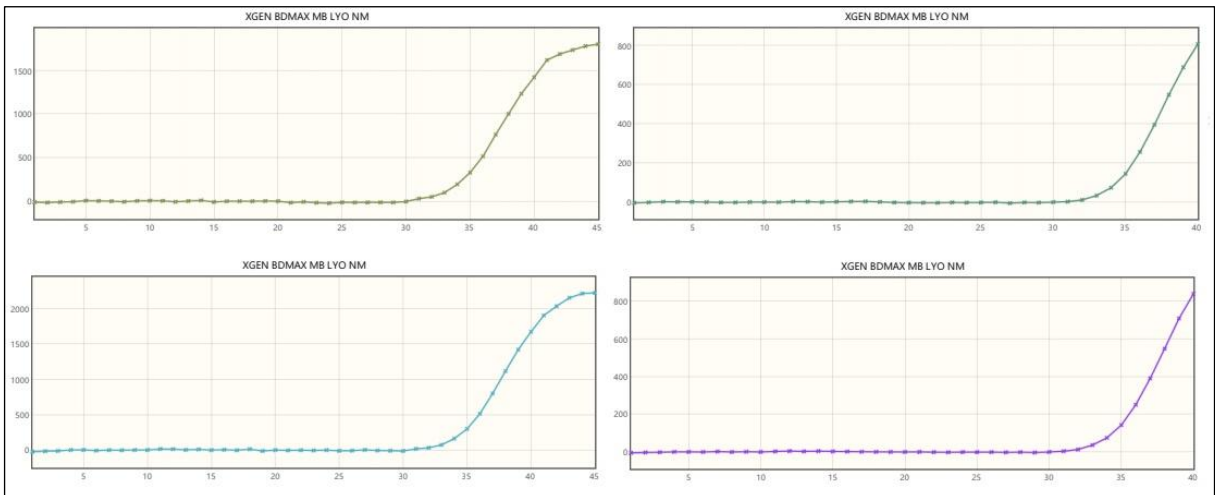
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 19 – Ensaio de Sensibilidade – P4 – *Neisseria meningitidis*



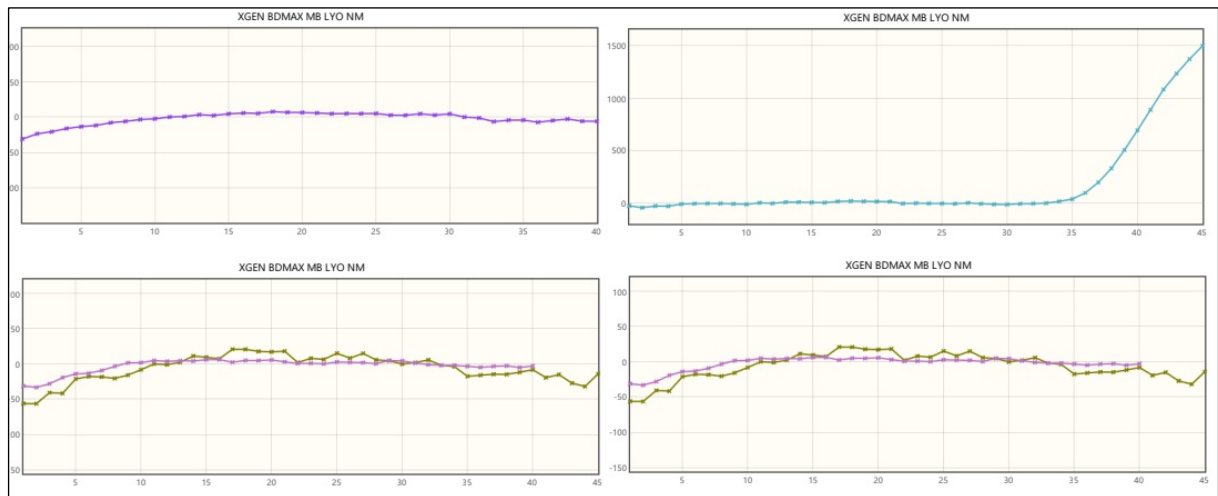
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 20 – Ensaio de Sensibilidade – P5 – *Neisseria meningitidis*



Fonte: Plataforma BD MAX™ System

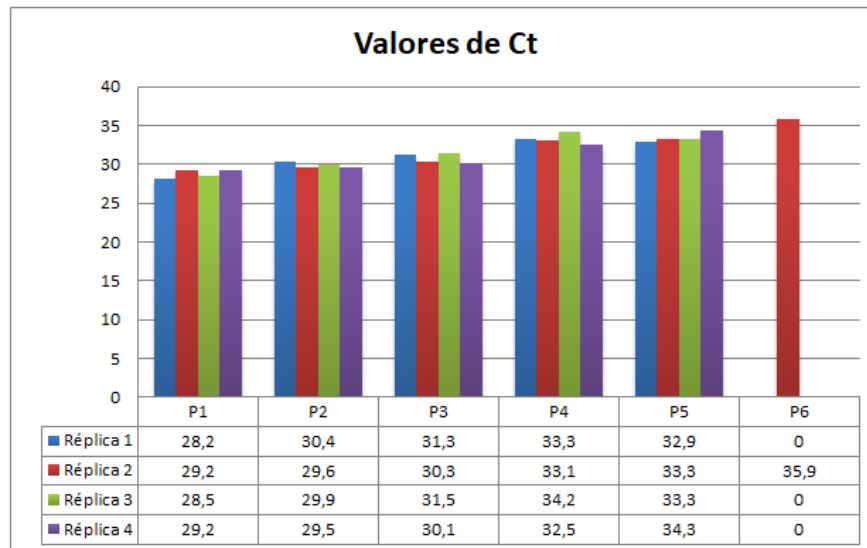
Figura 21 – Ensaio de Sensibilidade – P6 – *Neisseria meningitidis*



Fonte: Plataforma BD MAX™ System

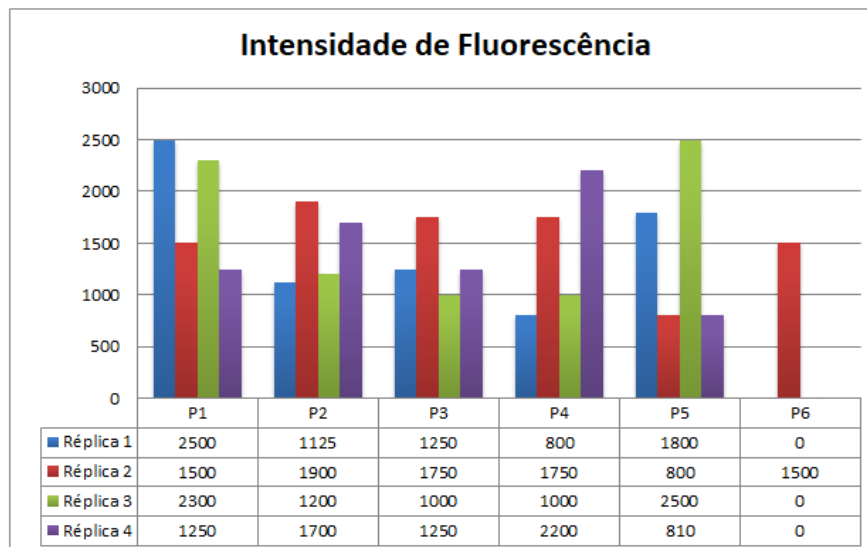
Após a análise, conforme demonstrado nas Figuras 22 e 23, os dados obtidos para o alvo *Neisseria meningitidis* demonstraram: para o ponto P1 um Ct máximo de 29,2 com fluorescência de 1250 e um Ct mínimo de 28,2 com fluorescência de 2500; para o ponto P2 um Ct máximo de 30,4 com fluorescência de 1125 e um Ct mínimo de 29,5 com fluorescência de 1700; para o ponto P3 um Ct máximo de 31,5 com fluorescência de 1000 e um Ct mínimo de 30,1 com fluorescência de 1250; para o ponto P4 um Ct máximo de 34,2 com fluorescência de 1000 e um Ct mínimo de 32,5 com fluorescência de 2200; para o ponto P5 um Ct máximo de 34,3 com fluorescência de 810 e um Ct mínimo de 32,9 com fluorescência de 1800; para o ponto P6 um Ct de 35,9 com fluorescência de 1500, sendo que houve a detecção de apenas uma das quatro replicatas.

Figura 22 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Valores de Ct – *Neisseria meningitidis*



Fonte: Próprio autor.

Figura 23 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Intensidade de Fluorescência – *Neisseria meningitidis*



Fonte: Próprio autor.

Portanto, os resultados obtidos confirmam a capacidade da plataforma BD MAX™ System de detectar os alvos do kit XGEN MULTI MB com curvas de amplificação em formato exponencial, resultados de detecção válidos (de acordo com as instruções de uso do kit XGEN MULTI MB) e valores de fluorescência conforme o padrão observado na rotina até a concentração indicada no ponto P5 que seria referente a aproximadamente 13 cópias/ μ L, sendo este o limite de detecção sugerido para o SSM MB.

5.2.2 Ensaios de Sensibilidade Analítica - *Streptococcus pneumoniae*

Neste ensaio foram realizados os testes de limite de detecção relacionados ao patógeno *Streptococcus pneumoniae*.

Como processamento inicial e com o objetivo de normalizar a concentração dos padrões sintéticos de todos os alvos, foram realizadas etapas de diluição inicial para obtenção de uma mistura (posteriormente denominada como Mistura PDS, amostra negativa e CI MB) com volume suficiente para realização de todos os ensaios da etapa (4 replicatas por ponto de diluição padrão) considerando um volume de 12,5 µL de material, para cada alvo testado.

Este volume de material foi definido considerando pontos de diluição padrão que ao final do processo resultassem em uma concentração aproximada de 17.000 cópias para P1, 10.000 cópias para P2, 5.000 cópias para P3, 1.000 cópias para P4, 500 cópias para P5 e 100 cópias para P6, para posterior processamento na plataforma BD MAX™ System, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Cálculo dos Pontos de Diluição Padrão para *Streptococcus pneumoniae*

Alvo/Título	P1	P2	P3	P4	P5	P6
<input type="checkbox"/> PDS Original	17000 cópias/µL					
Vol. de PDS usado	6 µL					
<input type="checkbox"/> obtida para PDS Original ¹	10200 cópias					
Vol. de amostra usado para diluição	64 µL					
<input type="checkbox"/> obtida PDS Diluído ²	1457,14 cópias/µL					
Vol. PDS Diluído usado para extração	11,67 µL	6,86 µL	3,43 µL	0,69 µL	0,35 µL	0,07 µL
Vol. de amostra negativa com CI MB usado para extração	0,83 µL	5,64 µL	9,07 µL	11,81 µL	12,15 µL	12,43 µL
Número de réplicas testadas	4	4	4	4	4	6
Volume total da Mistura PDS, amostra negativa e CI MB³	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	75 µL
<input type="checkbox"/> PDS Final em cópias/µL ⁴	1360,39	799,68	399,84	80,43	40,80	8,16
<input type="checkbox"/> PDS Final usado para extração ⁵	17004,86 cópias	9996,00 Cópias	4998,00 cópias	1005,43 cópias	510,00 cópias	102,00 cópias

Concentração; PDS: Padrão Sintético

¹Cálculo aplicado: PDS Original x Vol. de PDS usado

²Cálculo aplicado: PDS obtida para PDS Original / (Vol. de PDS usado + Vol.de amostra usada)

³Cálculo aplicado: (Vol. PDS Diluído usado para extração x Número de réplicas testadas) + (Vol. PDS Diluído usado para extração x Número de réplicas testadas)

⁴Cálculo aplicado: ([] obtida PDS Diluído x Vol. PDS Diluído usado para extração x Número de réplicas testadas) / Volume total da Mistura PDS, amostra negativa e CI MB.

⁵Cálculo aplicado: [] PDS Final em cópias/ μ L x 12,5 μ L

Fonte: Próprio autor.

Em relação ao processamento de amostras, resumidamente foram pipetados: 25 μ L de água no tubo cônico; 15 μ L de MIX MB em cada tubo de Master Mix; e 12,5 μ L da mistura PDS, amostra negativa e CI MB para cada ponto de diluição testado no tubo de reação.

Estes tubos, juntamente com o tubo de extração, foram adicionados em suas respectivas posições na tira de extração unitizada DNA-1 e inseridos no rack da plataforma BD MAX™ System para identificação e cadastro das amostras (Figura 10). A partir daí, as etapas de transferência de amostras, extração, amplificação e interpretação dos resultados de amplificação foram realizadas diretamente pela plataforma BD MAX™ System (Figura 11) com posterior análise e validação dos resultados pelo usuário.

Em relação às análises e validações de resultados realizadas pelo usuário, primeiramente, foi calculada a concentração de cada ponto de diluição padrão²⁵, conforme demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Cálculos de Concentração Esperada - Pontos de Diluição Padrão *Streptococcus pneumoniae*

Alvo/Título	[] Eluído em cópias/ μ L	[] Eluído em cópias/reação	[] Eluído + Mix MB (cópias/ μ L)
Cálculo aplicado	[] Final Padrão Sintético usado para extração ¹ / 37,5	[] Eluído em cópias/ μ L x 12,5	[] Eluído em cópias/reação/ 27,5 ²
P1	453,46	5668,29	206,12
P2	266,56	3332,00	121,16
P3	133,28	1666,00	60,58
P4	27,17	339,67	12,35
P5	13,60	170,00	6,18
P6	2,72	34,00	1,24

²⁵Para comparação direta entre os valores obtidos no ensaio proposto e os dados contidos na instrução de uso do Kit XGEN MULTI MB deve ser utilizada apenas a coluna “[] Eluído em cópias/ μ L”. Os dados referentes às colunas “[] Eluído em cópias/reação” e “[] Eluído + MIX MB em cópias/ μ L” são específicos por tipo de plataforma e não podem ser comparados entre equipamentos/plataformas distintas, uma vez que para os cálculos de concentração são considerados os volumes específicos utilizados pelo SSM em uso.

[]: Concentração.

¹Dados obtidos a partir da Tabela 6, linha “[] PDS Final usado para extração”;

²O volume de 27,5 µL é obtido da soma de 12,5 µL Eluído + 15 µL MIX MB.

Fonte: Próprio autor.

Em seguida, a partir dos dados obtidos, foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência, valores de Ct obtidos (Tabela 11) e de formato da curva (Figuras 24-29) para cada alvo.

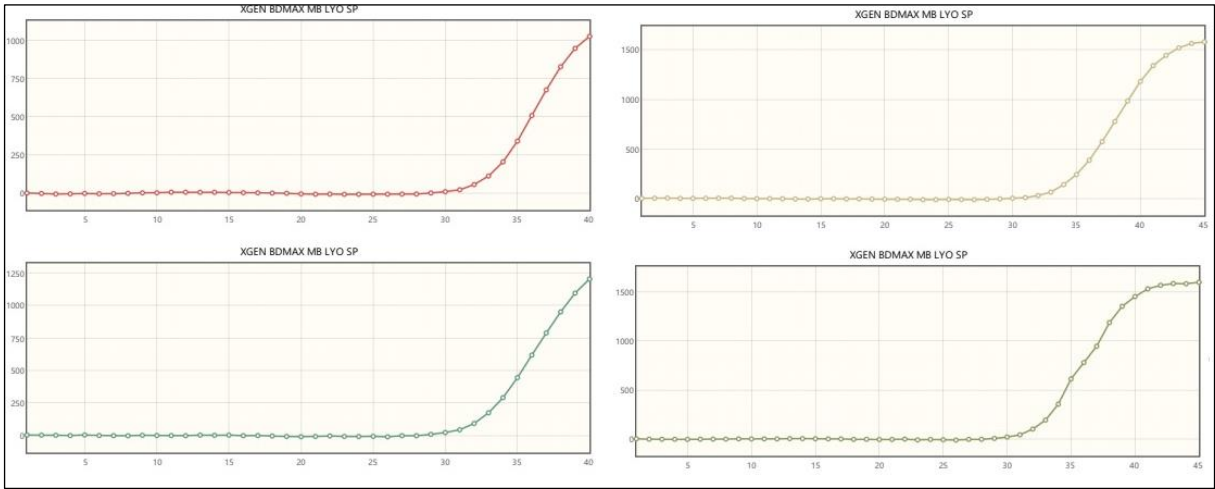
Tabela 11 - Valores de Ct e fluorescência – Ensaios de Sensibilidade Analítica – *Streptococcus pneumoniae*

Alvo	Ganho	Concentração em cópias/ µL	Ct	Fluorescência
P1 – Replicata 1	80	453,46	32,7	1000
P1 – Replicata 2	80		32,6	1500
P1 – Replicata 3	80		32,0	1200
P1 – Replicata 4	80		31,8	1600
P2 – Replicata 1	80	266,56	33,0	1800
P2 – Replicata 2	80		33,2	850
P2 – Replicata 3	80		33,4	1600
P2 – Replicata 4	80		34,3	1150
P3 – Replicata 1	80	133,28	34,7	1550
P3 – Replicata 2	80		35,3	800
P3 – Replicata 3	80		33,5	1800
P3 – Replicata 4	80		35,2	780
P4 – Replicata 1	80	27,17	Indeterminado	Indeterminado
P4 – Replicata 2	80		36,6	400
P4 – Replicata 3	80		36,8	420
P4 – Replicata 4	80		36,5	380
P5 – Replicata 1	80	13,60	36,9	670
P5 – Replicata 2	80		37,8	225
P5 – Replicata 3	80		36,5	1250
P5 – Replicata 4	80		37,8 ¹	100 ²
P6 – Replicata 1	80	2,72	Indeterminado	Indeterminado
P6 – Replicata 2	80		Indeterminado	Indeterminado
P6 – Replicata 3	80		Indeterminado	Indeterminado
P6 – Replicata 4	80		Indeterminado	Indeterminado

¹Realizado ajuste de *Threshold* manual pelo usuário; ²Curva Tardia.

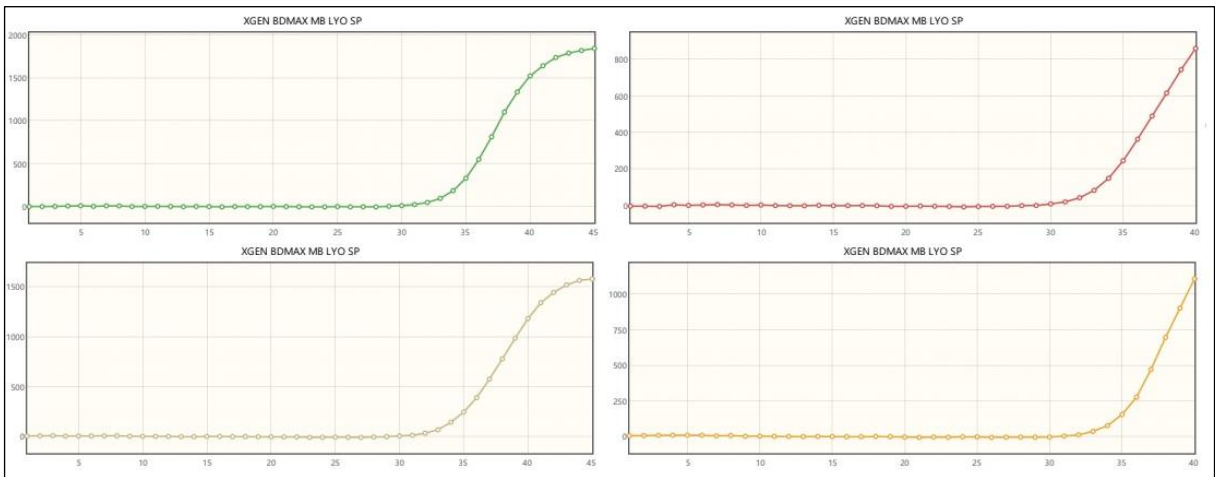
Fonte: Próprio autor.

Figura 24 – Ensaio de Sensibilidade – P1 – *Streptococcus pneumoniae*



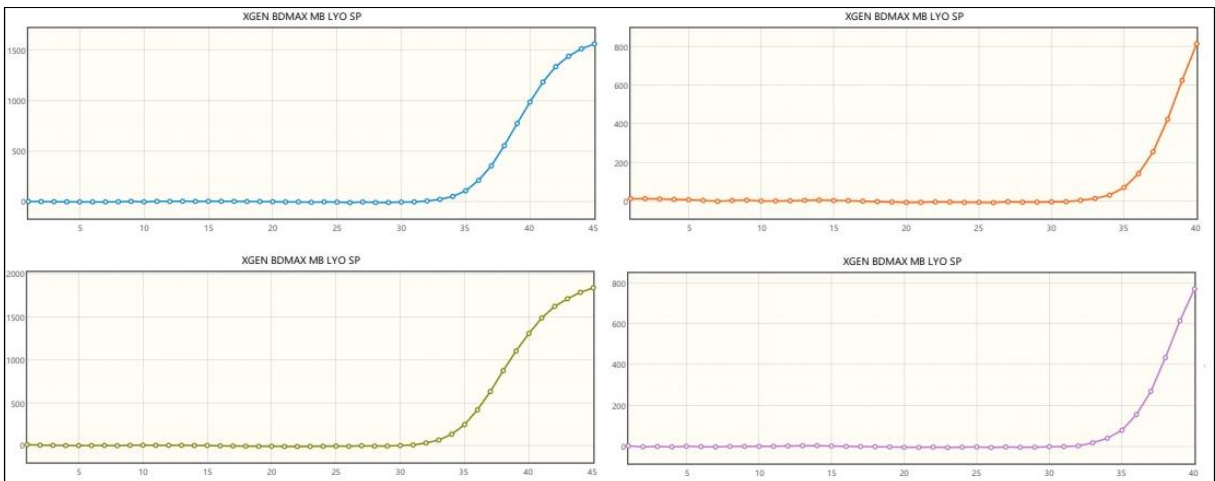
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 25 – Ensaio de Sensibilidade – P2 – *Streptococcus pneumoniae*



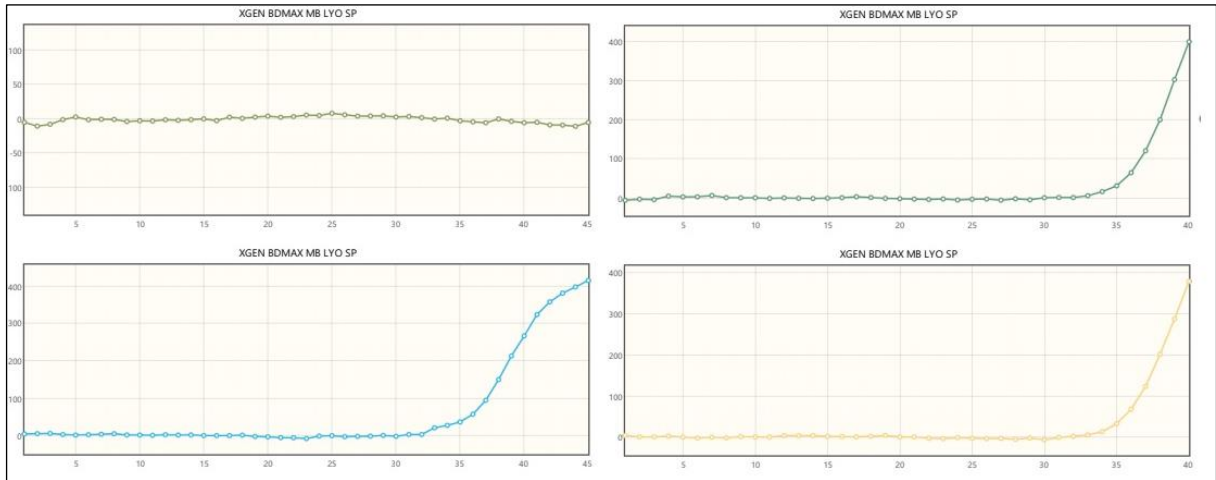
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 26 – Ensaio de Sensibilidade – P3 – *Streptococcus pneumoniae*



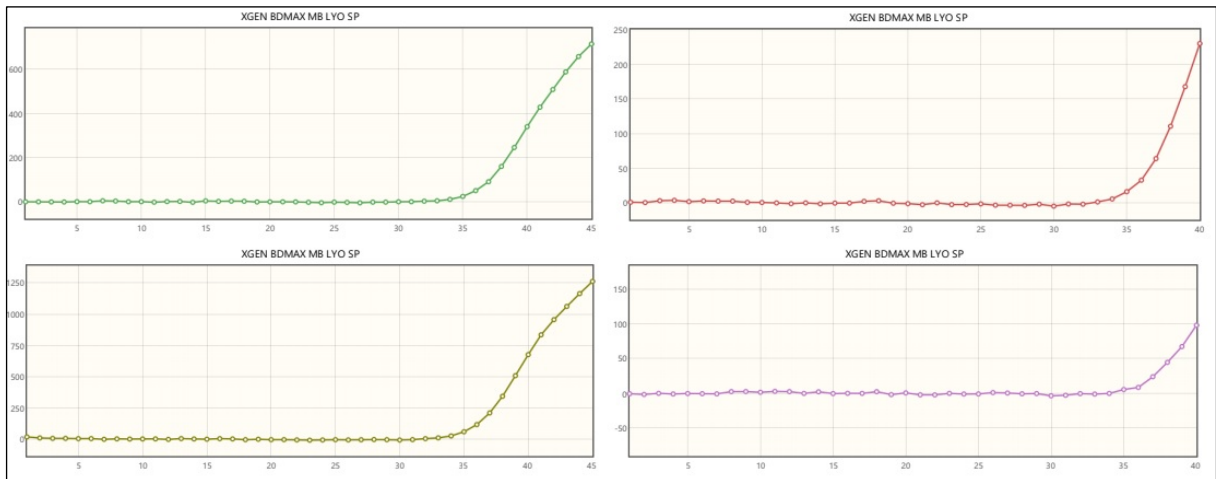
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 27 – Ensaio de Sensibilidade – P4 – *Streptococcus pneumoniae*



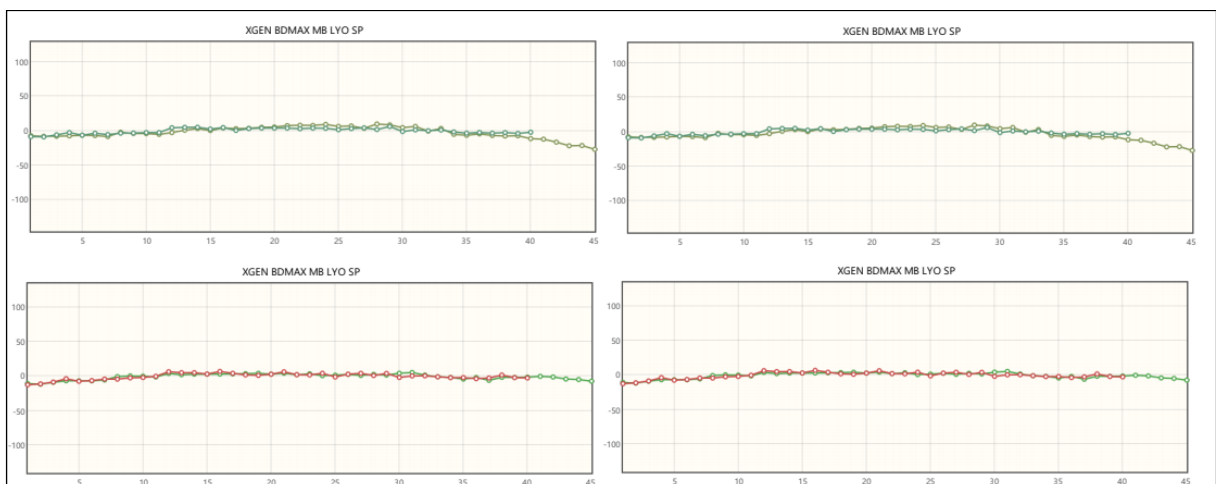
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 28 – Ensaio de Sensibilidade – P5 – *Streptococcus pneumoniae*



Fonte: Plataforma BD MAX™ System

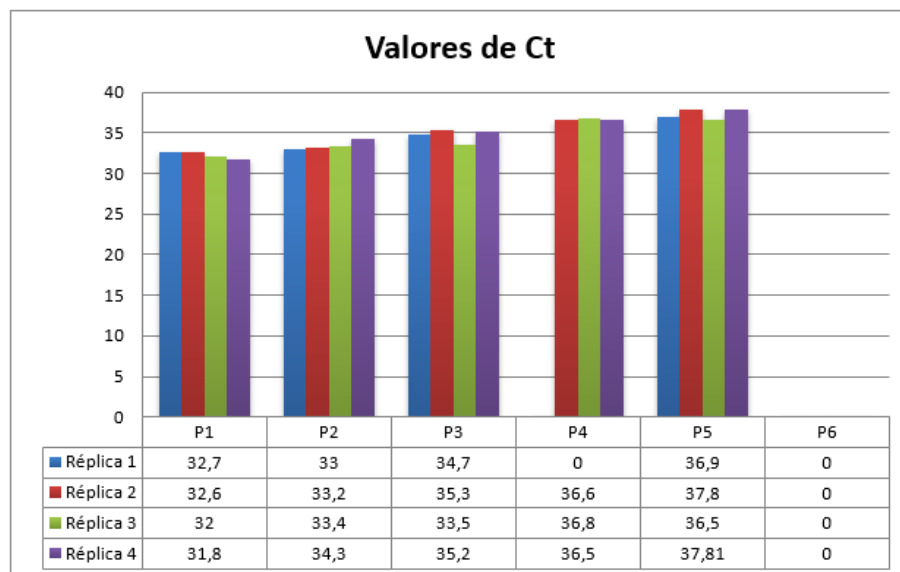
Figura 29 – Ensaio de Sensibilidade – P6 – *Streptococcus pneumoniae*



Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Após a análise, conforme demonstrado nas Figuras 30 e 31, os dados obtidos para o alvo *Streptococcus pneumoniae*, demonstraram: para o ponto P1, um Ct máximo de 32,7 com fluorescência de 1000 e um Ct mínimo de 31,8 com fluorescência de 1600; para o ponto P2, um Ct máximo de 34,3 com fluorescência de 1150 e um Ct mínimo de 33,0 com fluorescência de 1800; para o ponto P3, um Ct máximo de 35,3 com fluorescência de 800 e um Ct mínimo de 33,5 com fluorescência de 1800; para o ponto P4, um Ct máximo de 36,8 com fluorescência de 420 e um Ct mínimo de 36,5 com fluorescência de 380, sendo que houve a detecção de três das quatro réplicas²⁶; para o ponto P5, um Ct máximo de 37,8 com fluorescência de 100 e um Ct mínimo de 36,5 com fluorescência de 1250, sendo que foi necessário a realização de ajuste manual de *Threshold* para um dos pontos²⁷; para o ponto P6 não houve a detecção de nenhuma das quatro replicatas.

Figura 30 – Resultados Ensaios de Sensibilidade – Valores de Ct – *Streptococcus pneumoniae*

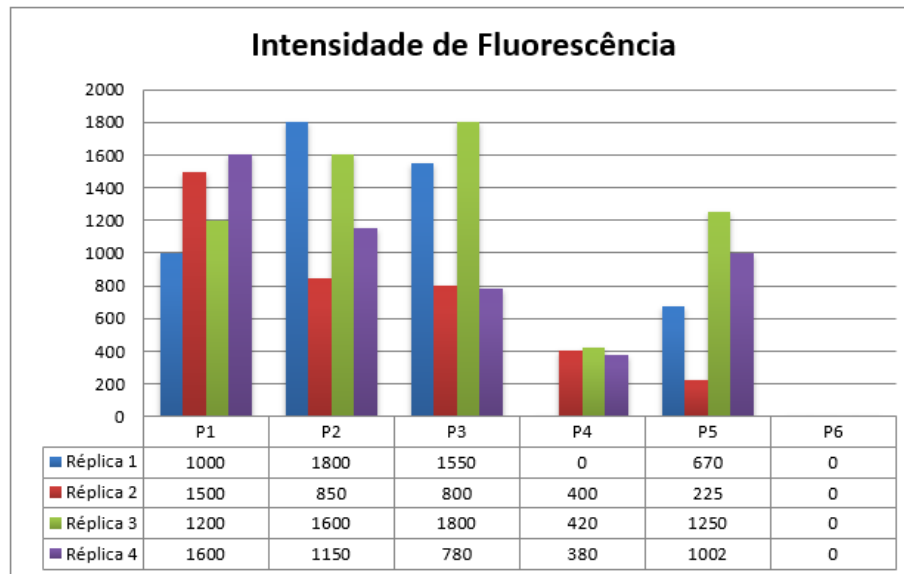


Fonte: Próprio autor.

²⁶Considerando que todas as replicatas do ponto P5, que apresentam menor concentração, foram detectadas, considerou-se esta ausência de detecção como uma possível falha operacional realizada pelo usuário

²⁷Conforme indicado na instrução de uso do Kit XGEN MULTI MB, a configuração de *Threshold* é uma exigência para validação da corrida. No entanto, como a plataforma BD Max já possui essa configuração automatizada, seu ajuste pelo usuário se torna necessário quando o *threshold* automático, por não estar corretamente inserido na fase exponencial da curva, invalida uma curva (Ct > 40) ou é incapaz de detectá-lo (Ct Indeterminado).

Figura 31 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Intensidade de Fluorescência – *Streptococcus pneumoniae*



Fonte: Próprio autor.

Portanto, os resultados obtidos confirmam a capacidade da plataforma BD MAX™ System de detectar os alvos do kit XGEN MULTI MB com curvas de amplificação em formato exponencial, resultados de detecção válidos (de acordo com as instruções de uso do kit XGEN MULTI MB) e valores de fluorescência conforme o padrão observado na rotina até a concentração indicada no ponto P5 que seria referente a aproximadamente 13 cópias/ μL , sendo este o limite de detecção sugerido para o SSM MB.

5.2.3 Ensaio de Sensibilidade Analítica - *Haemophilus influenzae*

Neste ensaio, foram realizados os testes de limite de detecção relacionados ao patógeno *Haemophilus influenzae*.

Como processamento inicial e com o objetivo de normalizar a concentração dos padrões sintéticos de todos os alvos, foram realizadas as etapas de diluição inicial para obtenção de uma mistura (posteriormente denominada como Mistura PDS, amostra negativa e CI MB) com volume suficiente para realização de todos os ensaios da etapa (4 replicatas por ponto de diluição padrão), considerando um volume de 12,5 μL de material para cada alvo testado.

Este volume de material foi definido considerando pontos de diluição padrão que, ao final do processo, resultassem em uma concentração aproximada de 17.000

cópias para P1, 10.000 cópias para P2, 5.000 cópias para P3, 1.000 cópias para P4, 500 cópias para P5 e 100 cópias para P6, com a finalidade de posterior processamento na plataforma BD MAX™ System, conforme demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Cálculo dos Pontos de Diluição Padrão para *Haemophilus influenzae*

Alvo/Título	P1	P2	P3	P4	P5	P6
<input type="checkbox"/> PDS Original	20000 cópias/ μ L					
Vol. de PDS usado	5 μ L					
<input type="checkbox"/> obtida para PDS Original ¹	10000 cópias					
Vol. de amostra usado para diluição	45 μ L					
<input type="checkbox"/> obtida PDS Diluído ²	2000,00 cópias/ μ L					
Vol. PDS Diluído usado para extração	8,50 μ L	5,00 μ L	2,50 μ L	0,50 μ L	0,25 μ L	0,05 μ L
Vol. de amostra negativa com CI MB usado para extração	4,00 μ L	7,50 μ L	10,00 μ L	12,00 μ L	12,25 μ L	12,45 μ L
Número de réplicas testadas	4	4	4	4	4	6
Volume total da Mistura PDS, amostra negativa e CI MB³	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	75 μL
<input type="checkbox"/> PDS Final em cópias/ μ L ⁴	1360,00	800,00	400,00	80,00	40,00	8,00
<input type="checkbox"/> PDS Final usado para extração ⁵	17000,00 cópias	10000,00 Cópias	5000,00 cópias	1000,00 cópias	500,00 Cópias	100,00 cópias

Concentração; PDS: Padrão Sintético

¹Cálculo aplicado: PDS Original x Vol. de PDS usado.

²Cálculo aplicado: PDS obtida para PDS Original / (Vol. de PDS usado + Vol.de amostra usada)

³Cálculo aplicado: (Vol. PDS Diluído usado para extração x Número de réplicas testadas) + (Vol. PDS Diluído usado para extração x Número de réplicas testadas)

⁴Cálculo aplicado: (obtida PDS Diluído x Vol. PDS Diluído usado para extração x Número de réplicas testadas) / Volume total da Mistura PDS, amostra negativa e CI MB.

⁵Cálculo aplicado: PDS Final em cópias/ μ L x 12,5 μ L

Fonte: Próprio autor.

Em relação ao processamento de amostras, resumidamente foram pipetados: 25 μ L de água no tubo cônico; 15 μ L de MIX MB em cada tubo de Master Mix; e 12,5 μ L da mistura PDS, amostra negativa e CI MB para cada ponto de diluição testado no tubo de reação.

Estes tubos, juntamente com o tubo de extração, foram adicionados em suas respectivas posições na tira de extração unitizada DNA-1 e inseridos no rack da plataforma BD MAX™ System para identificação e cadastro das amostras (Figura 10). A partir daí, as etapas de transferência de amostras, extração, amplificação e interpretação dos resultados de amplificação foram realizadas diretamente pela plataforma BD MAX™ System (Figura 11) com posterior análise e validação dos resultados pelo usuário.

Em relação às análises e validações de resultados realizadas pelo usuário, primeiramente, foi calculada a concentração de cada ponto de diluição padrão²⁸, conforme demonstrado na Tabela 13.

Tabela 13 – Cálculos de Concentração Esperada - Pontos de Diluição Padrão *Haemophilus influenzae*

Alvo/Título	[] Eluído em cópias/μL	[] Eluído em cópias/reação	[] Eluído + Mix MB (cópias/μL)
Cálculo aplicado	[] Final Padrão Sintético usado para extração ¹ / 37,5	[] Eluído em cópias/μL x 12,5	[] Eluído em cópias/reação/ 27,5 ²
P1	453,33	566,67	206,06
P2	266,67	3333,33	121,21
P3	133,33	1666,67	60,61
P4	27,03	337,84	12,29
P5	13,33	166,67	6,06
P6	2,67	33,33	1,21

[]: Concentração.

¹Dados obtidos a partir da Tabela 6, linha “[] PDS Final usado para extração”;

²O volume de 27,5 μL é obtido da soma de 12,5 μL Eluído + 15 μL MIX MB.

Fonte: Próprio autor.

Em seguida, a partir dos dados obtidos, foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência, valores de Ct obtidos (Tabela 14) e de formato da curva (Figuras 32-37) para cada alvo.

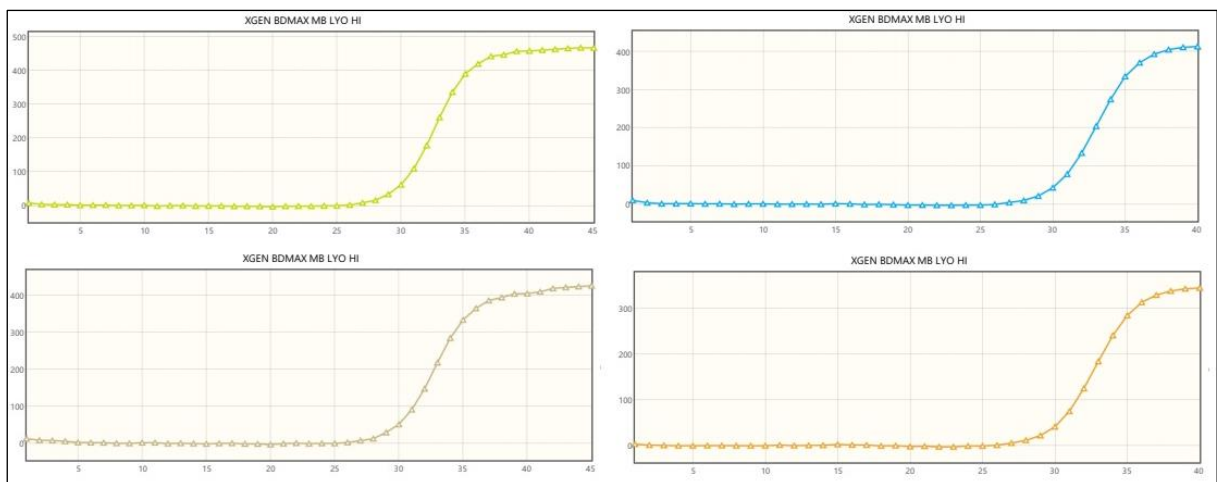
²⁸Lembrando que, para comparação direta entre os valores obtidos no ensaio proposto e os dados contidos na instrução de uso do Kit XGEN MULTI MB, deve ser utilizada apenas a coluna “[] Eluído em cópias/μL”. Os dados referentes às colunas “[] Eluído em cópias/reação” e “[] Eluído + MIX MB em cópias/μL” são específicos por tipo de plataforma e não podem ser comparados entre equipamentos/plataformas distintas, uma vez que para os cálculos de concentração são considerados os volumes específicos utilizados pelo SSM em uso.

Tabela 14 - Valores de Ct e fluorescência – Ensaio de Sensibilidade Analítica – *Haemophilus influenzae*

Alvo	Ganho	Concentração em cópias/ μL	Ct	Fluorescência
P1 – Replicata 1	80	453,33	30,5	480
P1 – Replicata 2	80		31,2	400
P1 – Replicata 3	80		30,9	410
P1 – Replicata 4	80		31,4	350
P2 – Replicata 1	80	266,67	32,0	450
P2 – Replicata 2	80		33,3	300
P2 – Replicata 3	80		32,1	450
P2 – Replicata 4	80		32,6	350
P3 – Replicata 1	80	133,33	34,5	300
P3 – Replicata 2	80		33,4	300
P3 – Replicata 3	80		32,4	450
P3 – Replicata 4	80		32,1	450
P4 – Replicata 1	80	27,03	37,9	380
P4 – Replicata 2	80		34,7	390
P4 – Replicata 3	80		36,5	405
P4 – Replicata 4	80		36,3	390
P5 – Replicata 1	80	13,33	37,8	380
P5 – Replicata 2	80		37,7	160
P5 – Replicata 3	80		36,2	340
P5 – Replicata 4	80		36,7	240
P6 – Replicata 1	80	2,67	39,9	250
P6 – Replicata 2	80		Indeterminado	Indeterminado
P6 – Replicata 3	80		Indeterminado	Indeterminado
P6 – Replicata 4	80		Indeterminado	Indeterminado

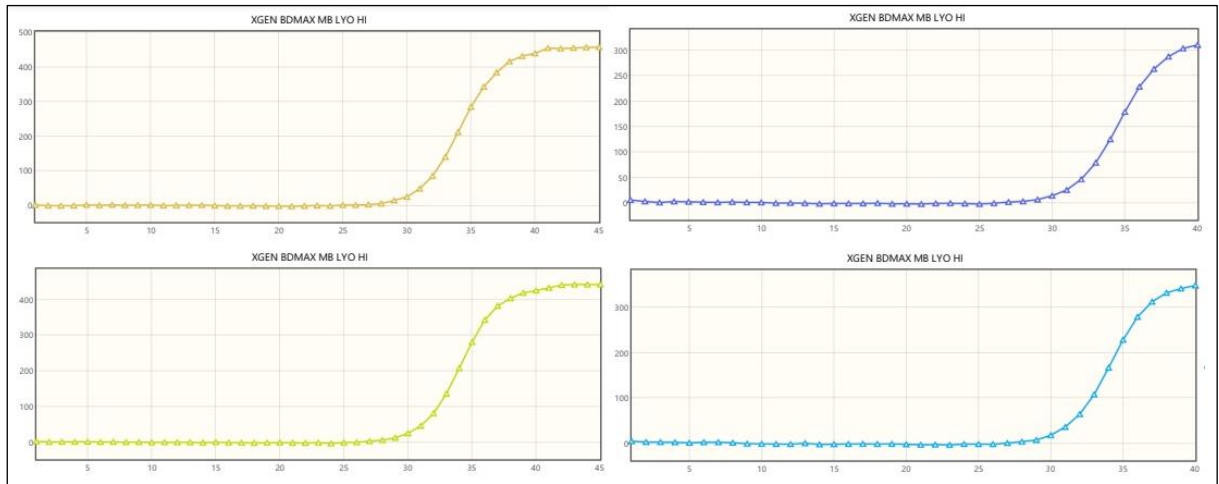
Fonte: Próprio autor.

Figura 32 – Ensaio de Sensibilidade – P1 – *Haemophilus influenzae*



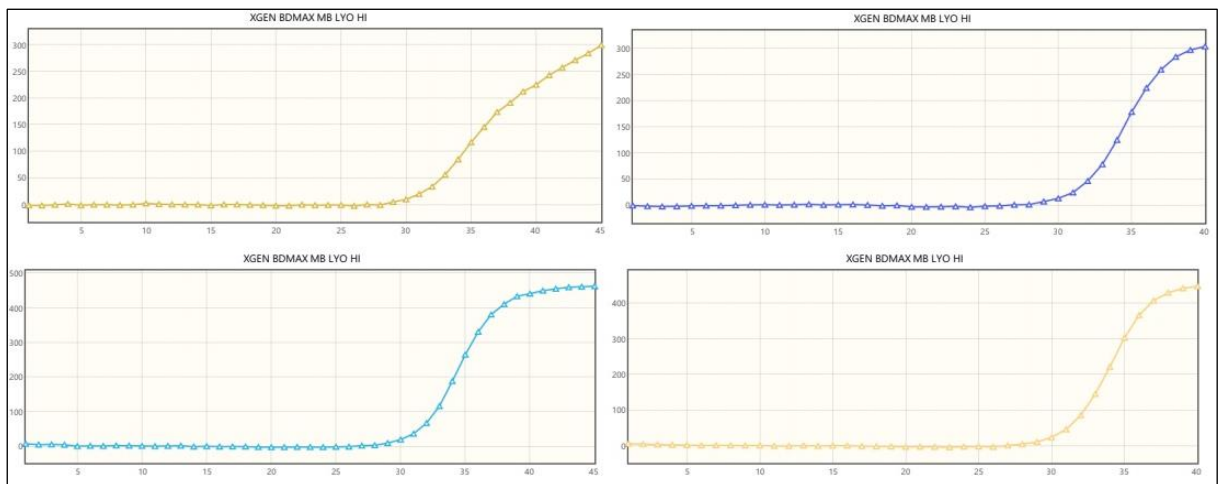
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 33 – Ensaio de Sensibilidade – P2 – *Haemophilus influenzae*



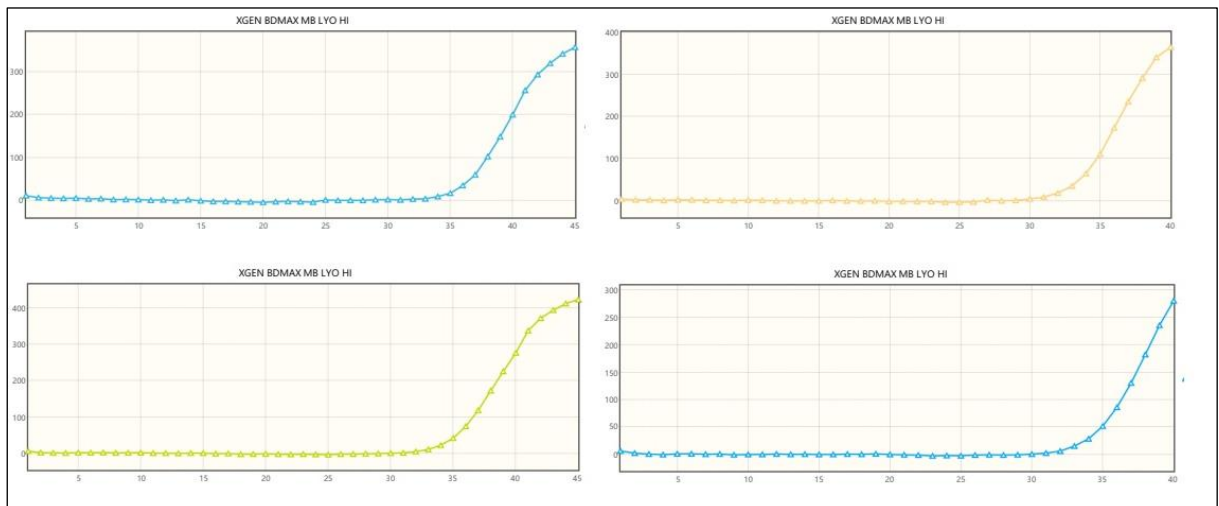
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 34 – Ensaio de Sensibilidade – P3 – *Haemophilus influenzae*



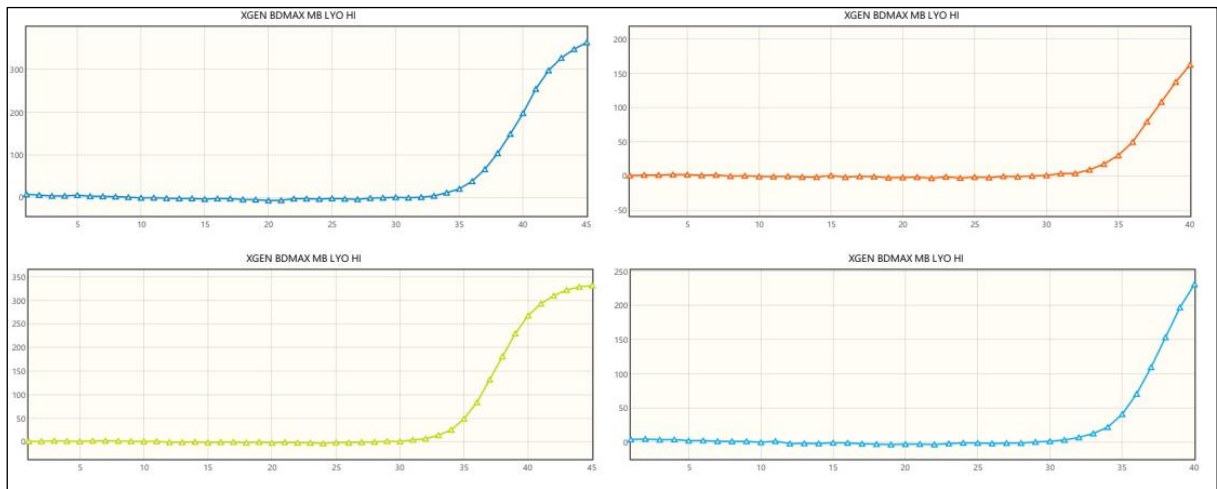
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 35 – Ensaio de Sensibilidade – P4 – *Haemophilus influenzae*



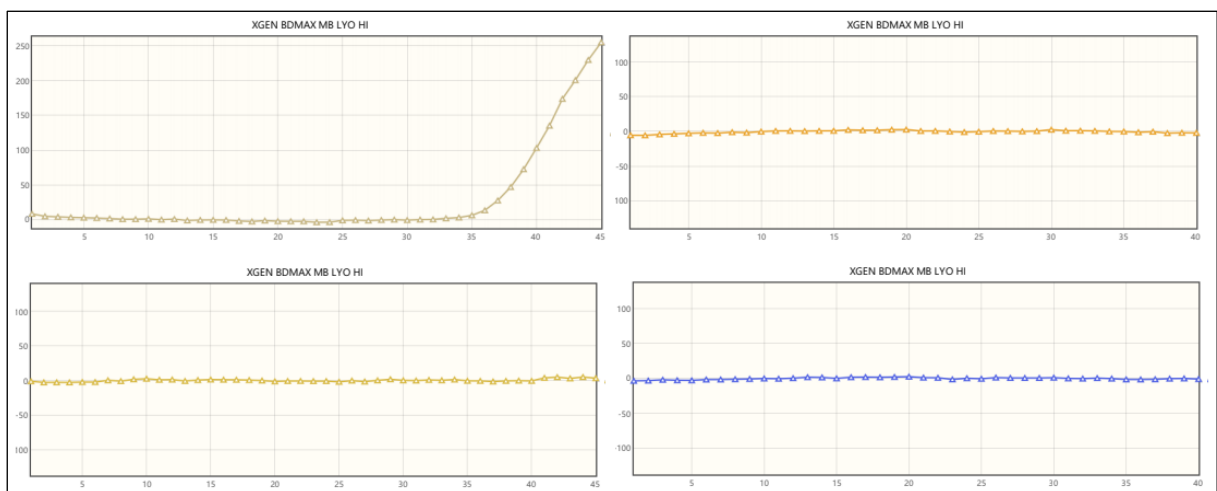
Fonte: Plataforma BD MAX™ System

Figura 36 – Ensaio de Sensibilidade – P5 – *Haemophilus influenzae*



Fonte: Plataforma BD MAX™ System

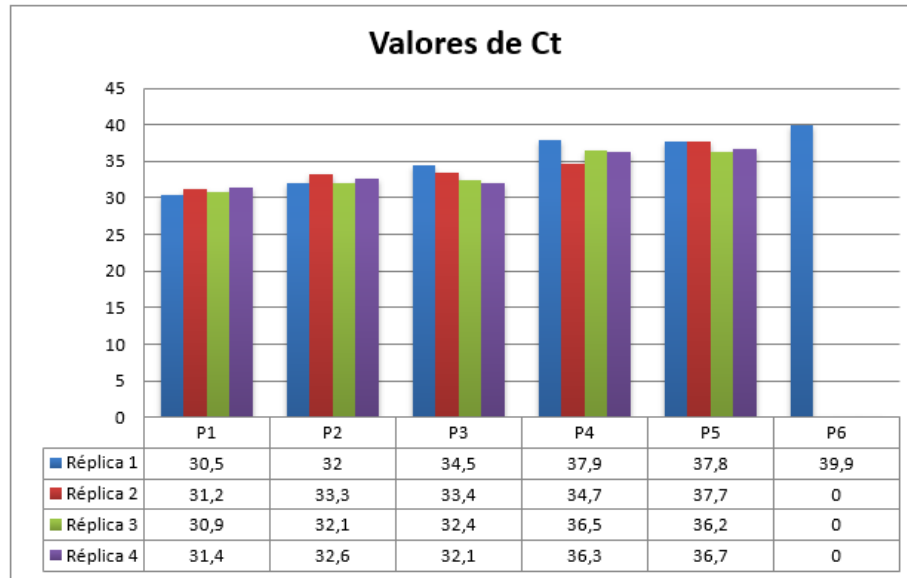
Figura 37 – Ensaio de Sensibilidade – P6 – *Haemophilus influenzae*



Fonte: Plataforma BD MAX™ System

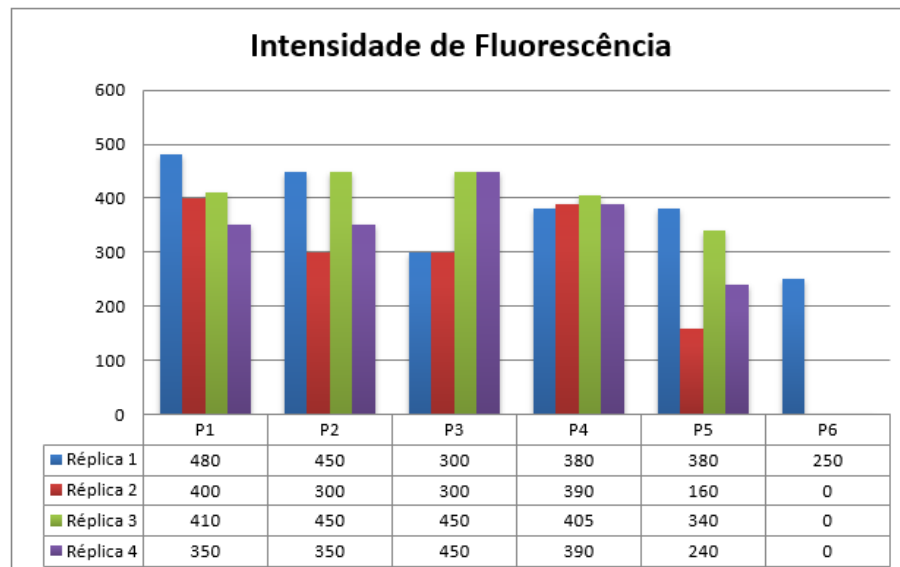
Após análise, conforme demonstrado nas Figuras 38 e 39, os dados obtidos com relação ao alvo *Haemophilus influenzae* demonstraram: para o ponto P1 um Ct máximo de 31,4 com fluorescência de 350 e um Ct mínimo de 30,5 com fluorescência de 480; para o ponto P2 um Ct máximo de 33,3 com fluorescência de 300 e um Ct mínimo de 32,0 com fluorescência de 450; para o ponto P3 um Ct máximo de 34,5 com fluorescência de 300 e um Ct mínimo de 32,1 com fluorescência de 450; para o ponto P4 um Ct máximo de 37,9 com fluorescência de 380 e um Ct mínimo de 34,7 com fluorescência de 390; para o ponto P5 um Ct máximo de 37,8 com fluorescência de 380 e um Ct mínimo de 36,2 com fluorescência de 340; para o ponto P6 um Ct de 39,9 com fluorescência de 250, sendo que houve a detecção de apenas uma das quatro replicatas.

Figura 38 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Valores de Ct – *Haemophilus influenzae*



Fonte: Próprio autor.

Figura 39 – Resultados Ensaio de Sensibilidade – Intensidade de Fluorescência – *Haemophilus influenzae*



Fonte: Próprio autor.

Portanto, os resultados obtidos confirmam a capacidade da plataforma BD MAX™ System de detectar os alvos do kit XGEN MULTI MB com curvas de amplificação em formato exponencial, resultados de detecção válidos (de acordo com as instruções de uso do kit XGEN MULTI MB) e valores de fluorescência de acordo com o padrão observado na rotina até a concentração indicada no ponto P5

que seria referente a aproximadamente 13 cópias/ μ L, sendo este o limite de detecção sugerido para o SSM MB.

5.3 ENSAIOS DE ESPECIFICIDADE ANALÍTICA – “CROSS-REACTIVITY”

Considerando que os ensaios de especificidade analítica são definidos, segundo BRASIL (2016, p. 70), como “a capacidade de um método analítico determinar somente o analito frente a outras substâncias presentes na amostra”. Para realização dos ensaios de especificidade analítica do SSM MB, optou-se por realizar a análise dos resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade analítica e verificar se foi realizada apenas a detecção do patógeno alvo, em seu canal específico, sem indícios de interferência de fluorescência em outros canais ópticos²⁹.

Para melhor controle de variáveis e menor desperdício de reagentes e amostras, foi utilizado um *layout* de validação por etapas, em que, primeiramente, foram utilizados os dados obtidos nos ensaios de sensibilidade analítica em cada patógeno alvo para verificação de possíveis invasões de fluorescência em outros canais ópticos (Etapa 1) e a, partir daí, em caso de resultados com invasão de fluorescência, seriam realizados ensaios de compensação de cor por meio da janela “*color compensation*”³⁰, até a obtenção de resultados considerados satisfatórios, ou seja, apenas do patógeno alvo, em seu canal específico, sem indícios de invasões de fluorescência em outros canais ópticos (Etapa 2)

Ao final dos ensaios de especificidade analítica, os parâmetros definidos serão utilizados como configuração padrão do SSM MB (Tabela 18).

²⁹Por tratar-se da validação de um sistema em que o painel de detecção molecular já possui registro na ANVISA, os dados de especificidade em relação a correta detecção dos *primers*, sondas e demais componentes do kit já foram previamente validados pelo fornecedor. Deste modo, foram analisados apenas as variáveis relacionadas a plataforma totalmente automatizada que poderiam afetar a especificidade do sistema. Neste caso, possíveis interferências de fluorescência entre os canais.

³⁰A janela “*color compensation*” é composta pelo “*False Receiving Channel*” (canal receptor falso) nas colunas, e o “*Excitation Channel*” (canal de excitação/fonte da interferência) nas linhas. O valor exibido é inserido em um percentual de 0,1 a 100 no campo desejado, em que 0% indica que nenhuma parte do “*Excitation Channel*” interfere no “*False Receiving Channel*” e 100% indica que tudo do “*Excitation Channel*” interfere no “*False Receiving Channel*”. No entanto, de acordo com a instrução de uso da plataforma, normalmente estes valores inseridos são baixos ficando entre 5% ou menos.

5.3.1 Ensaios de Especificidade Analítica - *Neisseria meningitidis*

Etapa 1

Para realização dos ensaios de especificidade analítica relacionados ao patógeno *Neisseria meningitidis*, primeiramente, foram analisados os valores de Ct, formato de curva e parâmetros de intensidade de fluorescência dos canais ROX (585/565) e FAM (475/520) de todas as replicatas dos pontos P1 a P5 obtidos nos ensaios de sensibilidade analítica do patógeno *Neisseria meningitidis*, para verificação de possíveis detecções relacionadas a outros patógenos (Tabela 15)³¹.

Tabela 15 – Análise Canais ROX e FAM – Ensaios de Especificidade Analítica – *Neisseria meningitidis*

Alvo	ROX (585/565)			FAM (475/520)		
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>			<i>Haemophilus influenzae</i>		
	Ct	Curva de amplificação	Intensidade de Fluorescência	Ct	Curva de amplificação	Intensidade de Fluorescência
P1 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P1 – Replicata 2	A	A	M	A	A	B
P1 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P1 – Replicata 4	A	A	M	A	A	B
P2 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P2 – Replicata 2	A	A	M	A	A	B
P2 – Replicata 3	A	A	M	A	A	B
P2 – Replicata 4	A	A	M	A	A	B
P3 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P4 –	A	A	B	A	A	B

³¹Cabe lembrar que, como estes canais são específicos para detecção dos patógenos *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, são esperados resultados de ausência de valores de Ct; ausência de curvas de amplificação e baixa intensidade de fluorescência em todas as replicatas.

Replicata 2						
P4 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B

A: ausente; B: baixa; M: Média

Fonte: Próprio autor.

Conforme demonstrado na Tabela 15, apesar de os resultados obtidos demonstrarem ausência de valores de Ct e de curvas de amplificação, foi observado que, devido à alta intensidade de fluorescência do canal óptico CY5 (630/665), foram obtidas invasões de fluorescência de intensidade média no canal óptico ROX (585/630), em duas replicatas do ponto P1 e três replicatas do ponto P2.

Assim, com o objetivo de eliminar este interferente e evitar possíveis problemas de interpretação de resultado, optou-se por realizar ensaios de compensação de cor usando a janela “*color compensation*” em diferentes condições, até a obtenção de resultados de intensidade de fluorescência considerados baixos (Etapa 2).

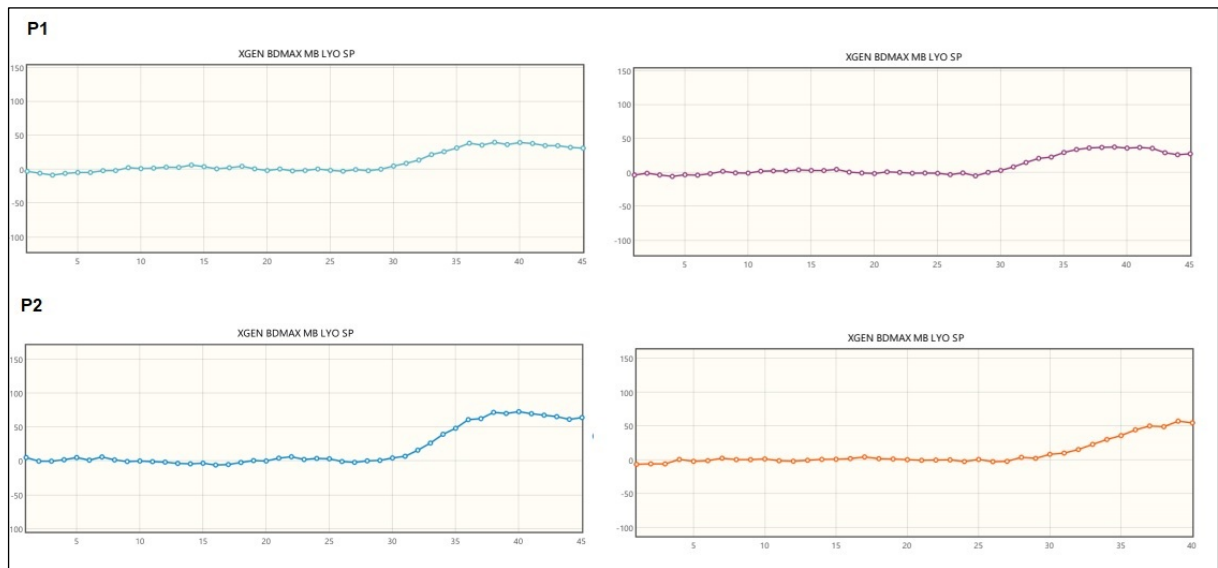
Etapa 2

Ensaio #1

Inicialmente foi aplicada uma compensação de cor de 3% na intersecção 630/665 – 585/630 da janela “*color compensation*”, sendo o canal CY5 (630/665), referente ao patógeno *Neisseria meningitidis*, considerado como “*Excitation Channel*” e o canal ROX (585/630), referente ao patógeno *Streptococcus pneumoniae*, considerado como “*False Receiving Channel*”.

Os ensaios foram realizados por meio da repetição em duplicata dos pontos que apresentaram invasão de fluorescência nos ensaios de sensibilidade analítica (pontos P1 e P2). A partir dos dados obtidos, foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência após o ajuste aplicado (Figura 40).

Figura 40 – Ensaios de Especificidade – *Neisseria meningitidis* – Ensaio #1



Fonte: Próprio autor.

Após a análise, os dados obtidos demonstraram que, mesmo com as compensações de cor realizadas, ainda foram identificados sinais de invasão de fluorescência de intensidade média (aproximadamente 50 de intensidade) no canal óptico ROX (585/630), para ambos os pontos P1 e P2 testados.

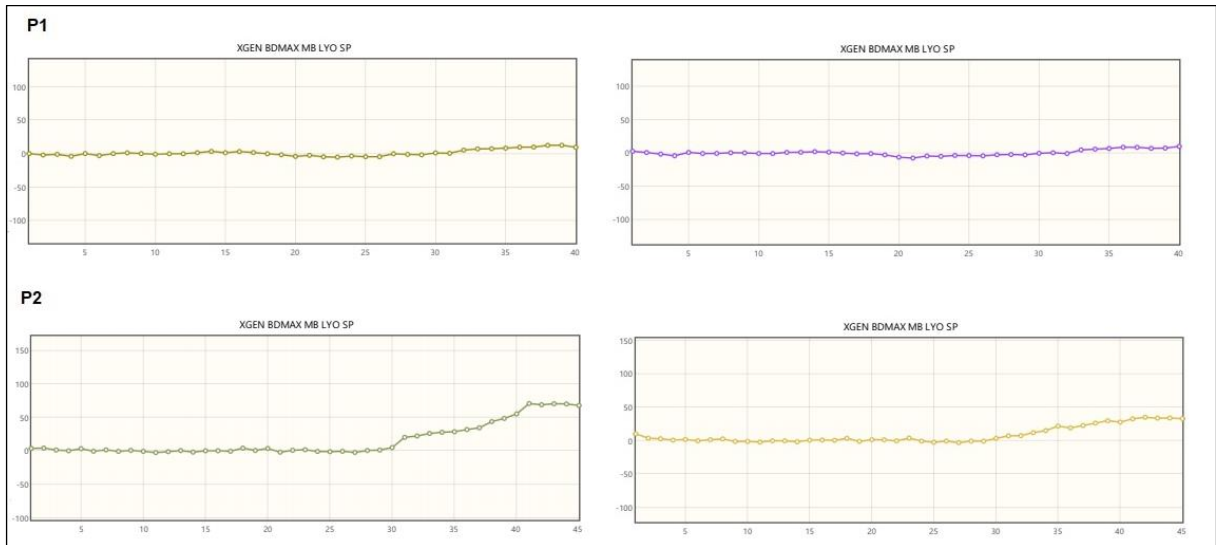
Deste modo, optou-se por realizar um novo ensaio, aumentando o parâmetro de compensação de cor para 3,5%.

Ensaio #2

Conforme definido no ensaio anterior, foi aplicada uma compensação de cor de 3,5% na intersecção 630/665 – 585/630 da janela “color compensation”, sendo o canal CY5 (630/665), referente ao patógeno *Neisseria meningitidis*, considerado como “Excitation Channel” e o canal ROX (585/630), referente ao patógeno *Streptococcus pneumoniae*, considerado como “False Receiving Channel”.

Os ensaios foram realizados por meio da repetição em duplicata dos pontos que apresentaram invasão de fluorescência nos ensaios de sensibilidade analítica (pontos P1 e P2). A partir dos dados obtidos, foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência após o ajuste aplicado (Figura 41).

Figura 41 – Ensaio de Especificidade – *Neisseria meningitidis* – Ensaio #2



Fonte: Próprio autor.

Após a análise, os dados obtidos demonstraram que, para o ponto P1, houve uma diminuição na intensidade de fluorescência no canal óptico ROX (585/630), fazendo com que os sinais de invasão de fluorescência, oriundos do canal óptico CY5 (630/665), não fossem mais identificados. Já para o ponto P2, verificou-se que, mesmo com as compensações de cor realizadas, ainda foram identificados sinais de invasão de fluorescência de intensidade média-baixa (aproximadamente 75 de intensidade) no canal óptico ROX (585/630).

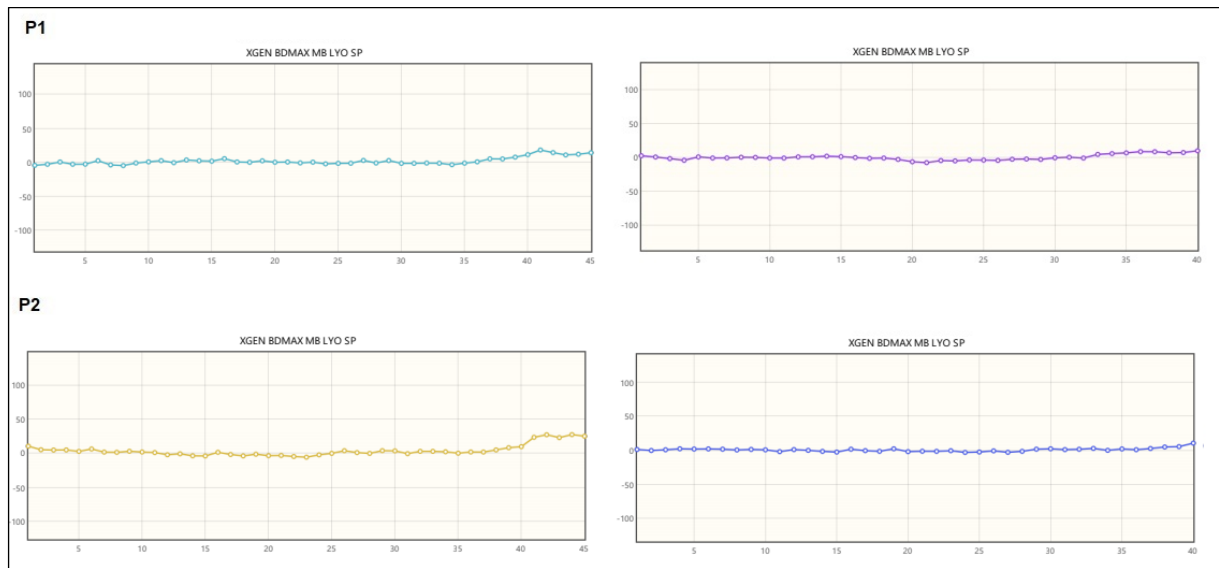
Deste modo, optou-se por realizar mais um ensaio, aumentando novamente o parâmetro de compensação de cor para 4%.

Ensaio #3

Conforme definido no ensaio anterior, foi aplicada uma compensação de cor de 4% na intersecção 630/665 – 585/630 da janela “color compensation”, sendo o canal CY5 (630/665), referente ao patógeno *Neisseria meningitidis*, considerado como “Excitation Channel” e o canal ROX (585/630), referente ao patógeno *Streptococcus pneumoniae*, considerado como “Fal.se Receiving Channel”.

Os ensaios foram realizados por meio da repetição em duplicata dos pontos que apresentaram invasão de fluorescência nos ensaios de sensibilidade analítica (pontos P1 e P2). A partir dos dados obtidos, foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência após o ajuste aplicado (Figura 42).

Figura 42 – Ensaios de Especificidade – *Neisseria meningitidis* – Ensaio #3



Fonte: Próprio autor.

Após análise, os dados obtidos demonstraram uma diminuição na intensidade de fluorescência para ambos os pontos P1 e P2, fazendo com que os sinais de invasão de fluorescência, oriundos do canal óptico CY5 (630/665), não fossem mais identificados.

Deste modo, elegeu-se o percentual de compensação de cor de 4% como o parâmetro que apresentou os melhores resultados nos ensaios realizados, sendo este o parâmetro eleito para a configuração padrão do SSM MB do patógeno *Neisseria meningitidis*.

Os resultados obtidos neste ensaio também confirmam a capacidade da plataforma BD MAX™ System de detectar apenas o patógeno alvo em seu canal específico, sem indícios de interferência de fluorescência em outros canais ópticos.

5.3.2 Ensaios de Especificidade Analítica - *Streptococcus pneumoniae*

Etapa 1

Para realização dos ensaios de especificidade analítica relacionados ao patógeno *Streptococcus pneumoniae*, primeiramente, foram analisados os valores de Ct, formato de curva e parâmetros de intensidade de fluorescência dos canais CY5 (630/665) e FAM (475/520) de todas as replicatas dos pontos P1 a P5 obtidos

nos ensaios de sensibilidade analítica do patógeno *Streptococcus pneumoniae*, para verificação de possíveis detecções relacionadas a outros patógenos (Tabela 15)³².

Tabela 16 – Análise Canais CY5 e FAM – Ensaios de Especificidade Analítica – *Streptococcus pneumoniae*

Alvo	CY5 (630/665) <i>Neisseria meningitidis</i>			FAM (475/520) <i>Haemophilus influenzae</i>		
	Ct	Curva de amplificação	Intensidade de Fluorescência	Ct	Curva de amplificação	Intensidade de Fluorescência
P1 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P1 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P1 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P1 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P2 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P2 – Replicata 2	A	A	MB	A	A	B
P2 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P2 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P5 –	A	A	B	A	A	B

³²Cabe lembrar que como estes canais são específicos para detecção dos patógenos *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, são esperados resultados de ausência de valores de Ct; ausência de curvas de amplificação e baixa intensidade de fluorescência em todas as replicatas.

 Replicata 4

A: ausente; B: baixa; MB: Média-baixa

Fonte: Próprio autor.

Conforme demonstrado na Tabela 16, apesar de os resultados obtidos demonstrarem ausência de valores de Ct e ausência de curvas de amplificação, foi observado que, devido à alta intensidade de fluorescência do canal óptico ROX (585/630), foram obtidas invasões de fluorescência de intensidade média-baixa no canal óptico CY5 (630/665), em uma replicata do ponto P2.

Assim, com o objetivo de eliminar este interferente e evitar possíveis problemas de interpretação de resultado, optou-se por realizar ensaios de compensação de cor usando a janela “color compensation” em diferentes condições, até a obtenção de resultados de intensidade de fluorescência considerados baixos (Etapa 2).

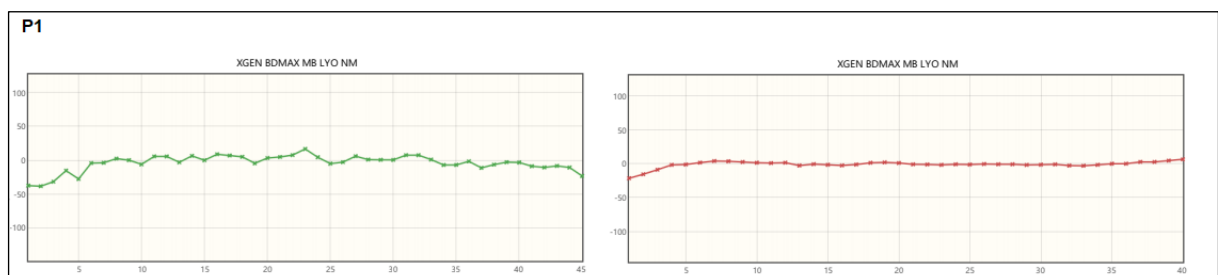
Etapa 2

Ensaio #1

Inicialmente foi aplicada uma compensação de cor de 2% na intersecção 630/665 – 585/630 da janela “color compensation”, sendo o canal ROX (585/630), referente ao patógeno *Streptococcus pneumoniae*, considerado como “Excitation Channel” e o canal CY5 (630/665), referente ao patógeno *Neisseria meningitidis*, considerado como “False Receiving Channel”.

Os ensaios foram realizados por meio da repetição em duplicata dos pontos que apresentaram invasão de fluorescência nos ensaios de sensibilidade analítica (ponto P2). A partir dos dados obtidos, foi realizada a análise dos parâmetros de intensidade de fluorescência após o ajuste aplicado (Figura 36).

Figura 43 – Ensaios de Especificidade – *Streptococcus pneumoniae* – Ensaio #1



Fonte: Próprio autor.

Após a análise, os dados obtidos demonstraram uma diminuição na intensidade de fluorescência para ambas as replicatas do ponto P1, fazendo com que os sinais de invasão de fluorescência, oriundos do canal óptico ROX (585/630), não fossem mais identificados.

Deste modo, elegeu-se o percentual de compensação de cor de 2% como o parâmetro que apresentou os melhores resultados nos ensaios realizados, sendo este o parâmetro eleito para a configuração padrão do SSM MB do patógeno *Streptococcus pneumoniae*.

Os resultados obtidos neste ensaio também confirmam a capacidade da plataforma BD MAX™ System de detectar apenas o patógeno alvo em seu canal específico, sem indícios de interferência de fluorescência em outros canais ópticos.

5.3.3 Ensaios de Especificidade Analítica - *Haemophilus influenzae*

Etapa 1

Para realização dos ensaios de especificidade analítica relacionados ao patógeno *Haemophilus influenzae*, primeiramente, foram analisados os valores de Ct, formato de curva e parâmetros de intensidade de fluorescência dos canais ROX (585/630) e CY5 (630/665) de todas as replicatas dos pontos P1 a P5 obtidos nos ensaios de sensibilidade analítica do patógeno *Haemophilus influenzae*, para verificação de possíveis detecções relacionadas a outros patógenos (Tabela 17)³³.

Tabela 17 – Análise Canais ROX e CY5 – Ensaios de Especificidade Analítica – *Haemophilus influenzae*

Alvo	ROX (585/630) <i>Streptococcus pneumoniae</i>			CY5 (630/665) <i>Neisseria meningitidis</i>		
	Ct	Curva de amplificação	Intensidade de Fluorescência	Ct	Curva de amplificação	Intensidade de Fluorescência
P1 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P1 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B

³³Vale lembrar que, como estes canais são específicos para detecção dos patógenos *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*, são esperados resultados de ausência de valores de Ct; ausência de curvas de amplificação e baixa intensidade de fluorescência em todas as replicatas.

P1 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P1 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P2 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P2 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P2 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P2 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P3 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P4 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 1	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 2	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 3	A	A	B	A	A	B
P5 – Replicata 4	A	A	B	A	A	B

A: ausente; B: baixa.

Fonte: Próprio autor.

Conforme demonstrado na Tabela 17, os resultados obtidos demonstraram ausência de valores de Ct, ausência de curvas de amplificação e parâmetros de intensidade de fluorescência baixos para todos os pontos analisados.

Deste modo, não foi necessária a aplicação de parâmetros de compensação de cor para o patógeno *Haemophilus influenzae*, uma vez que os resultados obtidos neste ensaio confirmam a capacidade da plataforma BD MAX™ System de detectar apenas o patógeno alvo em seu canal específico, sem indícios de interferência de fluorescência em outros canais ópticos.

Por fim, como forma de resumo dos parâmetros obtidos para os ensaios especificidade analítica, a partir das configurações definidas para o SSM MB nos ensaios descritos acima, foi criado o Quadro 10, com a ilustração de como deverá ser realizada a configuração padrão para a janela “*color compensation*” a partir de agora.

Quadro 10 – Ilustração da janela “color compensation” após definição da configuração padrão para o SSM MB

Excitation Channel	False Receiving Channel					
	Comprimento de onda	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
475/520	--	0	0	0	0	0
530/565	0	--	0	0	0	0
585/630	0	0	--	2.0	0	0
630/665	0	0	4.0	--	0	0
680/715	0	0	0	0	--	0

Fonte: Próprio autor.

5.4 ENSAIOS DE PRECISÃO

Considerando que os ensaios de precisão são definidos, segundo BRASIL (2016, p. 44), como “o quanto as medidas repetidas estão próximas umas das outras”, para realização dos ensaios de precisão do SSM MB, optou-se por realizar ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade para cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB, com o objetivo de verificar a concordância entre as medidas realizadas, conforme demonstrado abaixo.

5.4.1 Ensaios de Repetibilidade

Considerando que os ensaios de repetibilidade são definidos, segundo BRASIL (2016, p. 72), como “resultados de sucessivas medições de um mesmo analito em condições operacionais inalteradas”, para realização dos ensaios de repetibilidade do SSM MB, foram analisadas todas as replicatas dos pontos P1 a P5, obtidos nos ensaios de sensibilidade analítica, além da realização de um ensaio de quatro replicatas de um *pool* contendo os patógenos *Neisseria meningitidis*,

Streptococcus pneumoniae e *Haemophilus influenzae* em uma concentração média/alta³⁴.

Em relação às análises e validações realizadas pelo usuário, conforme sugerido por Rabenau et al. (2007), foram realizados cálculos de Ct médio, desvio padrão e coeficiente de variação para todas as replicatas testadas, segundo demonstrado na Tabela 18.

Como critérios de aceite, foram estabelecidos como satisfatórios os resultados que apresentaram um valor de desvio padrão entre as réplicas abaixo de 3,32 e um coeficiente de variação entre as réplicas abaixo de 10,00%. Estes valores foram definidos considerando as definições de Taylor et al. (2010), em que são esperados para resultados dentro do mesmo log de detecção uma variação inferior a 3,32 Cts entre as replicatas.

Tabela 18 – Ensaio de Repetibilidade

Alvo	Ct	Ct Médio	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
<i>Neisseria meningitidis</i>				
P1 – Replicata 1	28,2	28,8	0,44	0,02
P1 – Replicata 2	29,2			
P1 – Replicata 3	28,5			
P1 – Replicata 4	29,2			
P2 – Replicata 1	30,4	29,9	0,35	0,01
P2 – Replicata 2	29,6			
P2 – Replicata 3	29,9			
P2 – Replicata 4	29,5			
P3 – Replicata 1	31,3	30,8	0,61	0,02
P3 – Replicata 2	30,3			
P3 – Replicata 3	31,5			
P3 – Replicata 4	30,1			
P4 – Replicata 1	33,3	33,3	0,61	0,02
P4 – Replicata 2	33,1			
P4 – Replicata 3	34,2			
P4 – Replicata 4	32,5			
P5 – Replicata 1	32,9	33,5	0,52	0,02
P5 – Replicata 2	33,3			
P5 – Replicata 3	33,3			
P5 – Replicata 4	34,3			
Pool – Replicata 1	31,3	31,9	0,53	0,02
Pool – Replicata 2	32,4			

³⁴ Amostras previamente conhecidas como negativas utilizadas em conjunto com padrões sintéticos na mesma concentração do ponto de diluição P3, ou seja, com aproximadamente 1000 cópias (verificar Tópico 4.3.2.1, Tabelas 6, 7 e 8 para cálculos realizados).

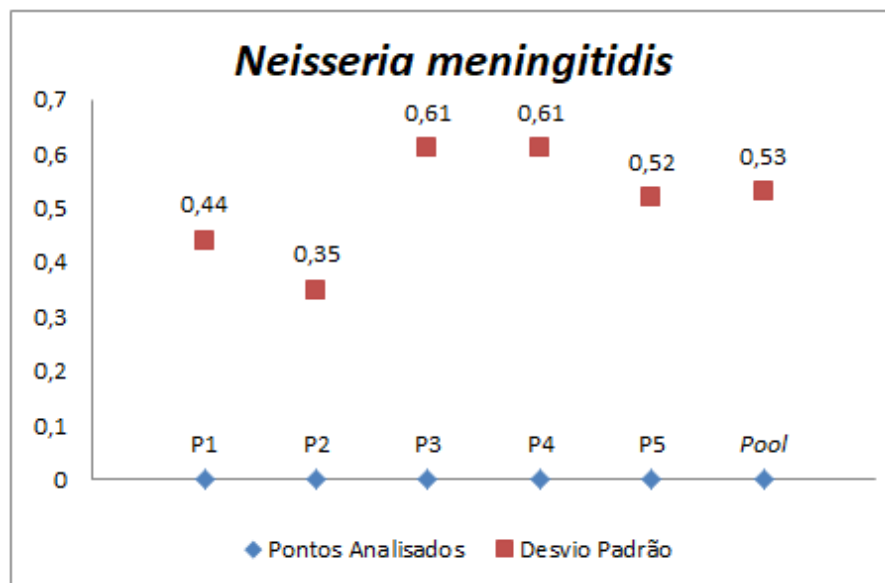
<i>Pool</i> – Replicata 3	31,5			
<i>Pool</i> – Replicata 4	32,5			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				
P1 – Replicata 1	32,7			
P1 – Replicata 2	32,6	32,3	0,38	0,01
P1 – Replicata 3	32,0			
P1 – Replicata 4	31,8			
P2 – Replicata 1	33,0			
P2 – Replicata 2	33,2	33,5	0,50	0,01
P2 – Replicata 3	33,4			
P2 – Replicata 4	34,3			
P3 – Replicata 1	34,7			
P3 – Replicata 2	35,3	34,7	0,72	0,02
P3 – Replicata 3	33,5			
P3 – Replicata 4	35,2			
P4 – Replicata 1	Indeterminado			
P4 – Replicata 2	36,6	36,6	0,12	0,00
P4 – Replicata 3	36,8			
P4 – Replicata 4	36,5			
P5 – Replicata 1	36,9			
P5 – Replicata 2	37,8	37,3	0,57	0,02
P5 – Replicata 3	36,5			
P5 – Replicata 4	37,8			
<i>Pool</i> – Replicata 1	35,0 ¹			
<i>Pool</i> – Replicata 2	35,7	34,9	0,60	0,02
<i>Pool</i> – Replicata 3	34,9			
<i>Pool</i> – Replicata 4	34,0 ¹			
<i>Haemophilus influenzae</i>				
P1 – Replicata 1	30,5			
P1 – Replicata 2	31,2	31,0	0,34	0,01
P1 – Replicata 3	30,9			
P1 – Replicata 4	31,4			
P2 – Replicata 1	32,0			
P2 – Replicata 2	33,3	32,5	0,51	0,02
P2 – Replicata 3	32,1			
P2 – Replicata 4	32,6			
P3 – Replicata 1	34,5			
P3 – Replicata 2	33,4	33,1	0,94	0,03
P3 – Replicata 3	32,4			
P3 – Replicata 4	32,1			
P4 – Replicata 1	37,9			
P4 – Replicata 2	34,7	36,4	1,13	0,03
P4 – Replicata 3	36,5			
P4 – Replicata 4	36,3			
P5 – Replicata 1	37,8			
P5 – Replicata 2	37,7	37,1	0,67	0,02
P5 – Replicata 3	36,2			
P5 – Replicata 4	36,7			
<i>Pool</i> – Replicata 1	34,0 ¹			
<i>Pool</i> – Replicata 2	33,2 ¹	33,6	0,33	0,01
<i>Pool</i> – Replicata 3	33,3 ¹			
<i>Pool</i> – Replicata 4	33,8 ¹			

¹Realizado ajuste de threshold manual.

Fonte: Próprio autor.

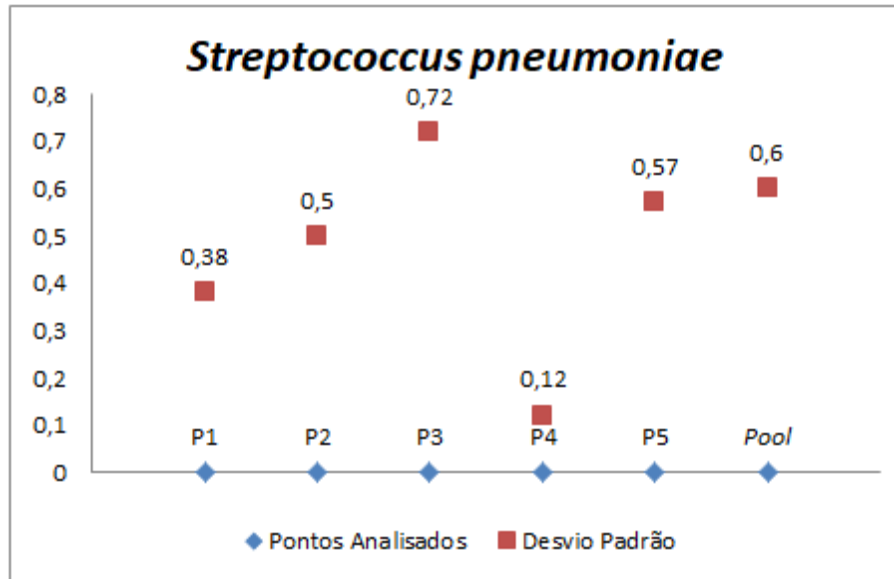
Após a análise, conforme demonstrado nas Figuras 44-46, os dados obtidos demonstraram: a) para o alvo *Neisseria meningitidis* um desvio padrão máximo de 0,61 com coeficiente de variação de 0,02% nos pontos P3 e P4 e um desvio padrão mínimo de 0,44 com coeficiente de variação de 0,02% no ponto P1; b) para o alvo *Streptococcus pneumoniae* um desvio padrão máximo de 0,72 com coeficiente de variação de 0,02 no ponto P3 e um desvio padrão mínimo de 0,12 com um coeficiente de variação de 0,00% no ponto P4; c) para o alvo *Haemophilus influenza* um desvio padrão máximo de 1,13 com coeficiente de variação de 0,03% no ponto P4 e um desvio padrão mínimo de 0,33 com coeficiente de variação de 0,01 no *pool* de amostras.

Figura 44 – Resultados Ensaio de Repetibilidade – *Neisseria meningitidis*



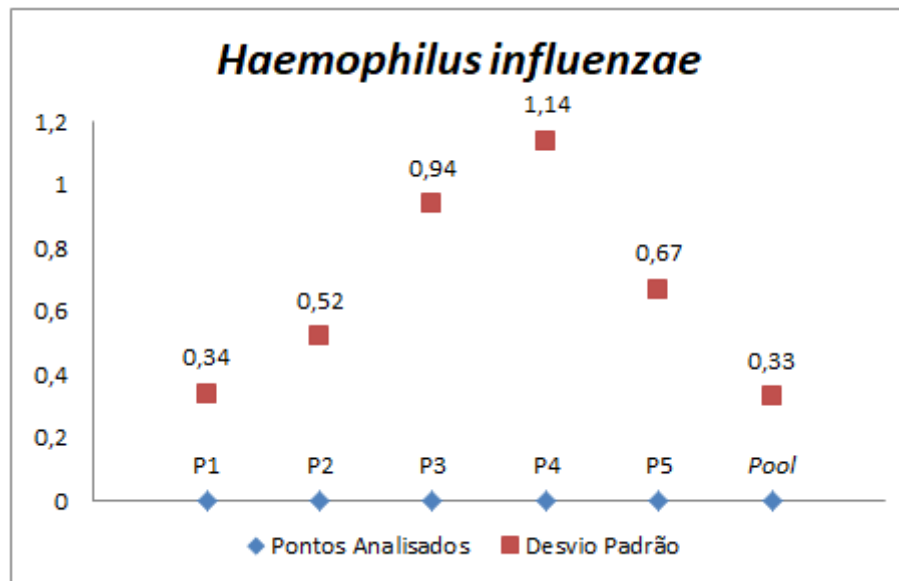
Fonte: Próprio autor.

Figura 45 – Resultados Ensaio de Repetibilidade – *Streptococcus pneumoniae*



Fonte: Próprio autor.

Figura 46 – Resultados Ensaio de Repetibilidade – *Haemophilus influenzae*



Fonte: Próprio autor.

Também foi observado, na Tabela 18, que os valores de Ct médio, desvio padrão e coeficiente de variação entre as replicatas dos pontos P3 e os *pools* de amostra (que apresentavam a mesma concentração do ponto P3) se mantiveram muito próximos para todos os alvos, indicando que a existência de múltiplos patógenos em uma mesma amostra não seria um interferente em termos de detecção para este sistema.

Deste modo, os resultados obtidos neste ensaio confirmam a capacidade do SSM MB de detectar medições sucessivas de um mesmo analito, em condições operacionais inalteradas, com resultados concordantes e dentro dos critérios de aceite proposto.

5.4.2 Ensaio de Reprodutibilidade

Considerando que os ensaios de reprodutibilidade são definidos, segundo BRASIL (2016, p. 72), como “resultados de sucessivas medições de um mesmo analito em condições operacionais distintas”, para realização dos ensaios de reprodutibilidade do SSM MB, foram utilizadas duas replicatas do ponto P3 e duas replicatas do ponto mais baixo detectado nos ensaios de sensibilidade analítica (Ponto P5: LOD) em três corridas distintas, para cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB.

Em relação às análises e validações realizadas pelo usuário, conforme sugerido por Rabenau et al. (2007), foram realizados cálculos de Ct médio, desvio padrão e coeficiente de variação entre as corridas realizadas, conforme demonstrado na Tabela 19.

Como critérios de aceite, foram estabelecidos como satisfatórios os resultados que apresentaram um valor de desvio padrão entre as corridas abaixo de 3,32 e um coeficiente de variação entre as corridas abaixo de 10,00%. Estes valores foram definidos considerando as definições de Taylor et al. (2010), em que são esperados para resultados dentro do mesmo log de detecção uma variação inferior a 3,32 Cts entre as replicatas.

Tabela 19 – Ensaios de Reprodutibilidade

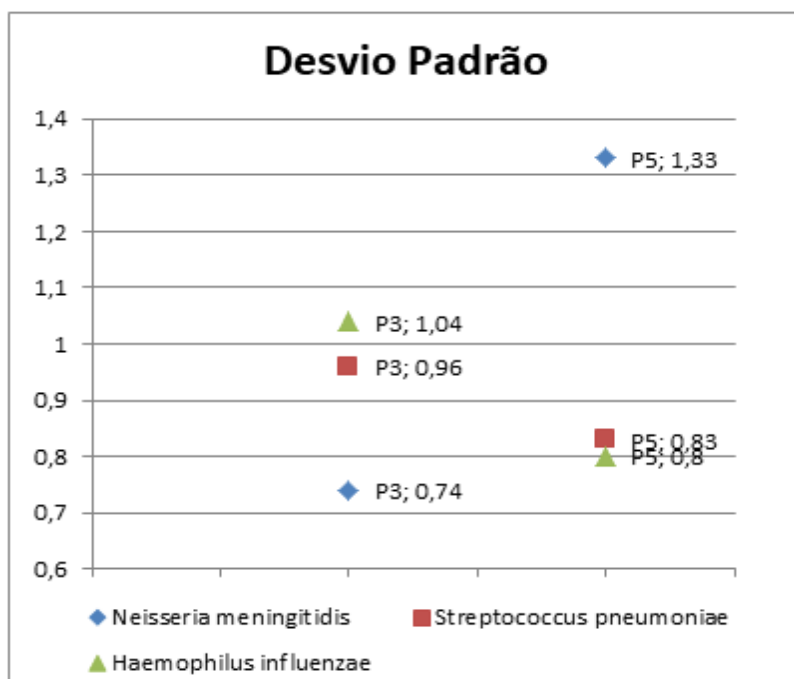
Alvo	Cts Corrida 1	Cts Corrida 2	Cts Corrida 3	Ct Médio	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
<i>Neisseria meningitidis</i>						
P3 – Replicata 1	31,3	31,5	30,3	31,6	0,74	0,02
P3 – Replicata 2	32,4	32,5	31,3			
P5 – Replicata 1	32,9	31,5	35,6	33,5	1,33	0,04
P5 – Replicata 2	33,3	32,5	33,9			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>						
P3 – Replicata 1	35,7	36,4	34,7	35,8	0,96	0,03
P3 – Replicata 2	37,5	34,9	35,3			
P5 – Replicata 1	36,9	35,6	ND ²	36,9	0,83	0,02
P5 – Replicata 2	37,8	36,5 ¹	37,8			
<i>Haemophilus influenzae</i>						
P3 – Replicata 1	35,8	33,8	34,5	34,9	1,04	0,03
P3 – Replicata 2	35,8	36,0	33,4			
P5 – Replicata 1	38,4	37,8	36,2	37,4	0,80	0,02
P5 – Replicata 2	ND ²	37,7	36,7			

¹Realizado ajuste de threshold manual; ²ND: Não detectado

Fonte: Próprio autor.

Após a análise, conforme demonstrado na Figura 47, os dados obtidos demonstraram: a) para o alvo *Neisseria meningitidis*, um desvio padrão máximo de 1,33 com coeficiente de variação de 0,04% e um desvio padrão mínimo de 0,74 com coeficiente de variação de 0,02%; b) para o alvo *Streptococcus pneumoniae*, um desvio padrão máximo de 0,96 com coeficiente de variação de 0,03%, sendo que houve a detecção de cinco das seis replicatas testadas para o ponto P5 e um desvio padrão mínimo de 0,83 com coeficiente de variação de 0,02%; c) para o alvo *Haemophilus influenzae*, um desvio padrão máximo de 1,04 com coeficiente de variação de 0,03% e um desvio padrão mínimo de 0,80 com coeficiente de variação de 0,02.

Figura 47 – Resultados Ensaio de Reprodutibilidade



Fonte: Próprio autor.

Deste modo, os resultados obtidos neste ensaio confirmam a capacidade do SSM MB de detectar medições sucessivas de um mesmo analito, em condições operacionais distintas, com resultados concordantes e dentro dos critérios de aceite proposto.

5.5 ENSAIOS DE EXATIDÃO/ACURÁCIA

Considerando que os ensaios de exatidão/acurácia são definidos, segundo BRASIL (2016, p. 44), como “o quão próximo do valor real (valor normalmente aceito como referência) está o valor obtido na medição”, para realização dos ensaios de exatidão/acurácia do SSM MB, optou-se por realizar ensaios comparativos de detecção entre as plataformas BD Max™ System (em validação) e QuantStudio™ 5 (referência)³⁵, com o objetivo de verificar se os valores de medição obtidos pela plataforma BD Max™ System estão próximos aos valores obtidos pela plataforma QuantStudio™ 5 (resultado aceito como verdadeiramente correto).

Para realização dos ensaios foram utilizadas as mesmas amostras para ambas as plataformas, sendo os testes compostos por: uma replicata de uma amostra negativa para todos os patógenos contidos no kit XGEN MULTI MB; uma replicata de uma amostra positiva alta (ponto P2), para cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB; uma replicata de uma amostra positiva baixa (ponto P4), para cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB; duas replicatas de uma amostra positiva baixa no limite de detecção (ponto P5), para cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB; e duas replicatas de um *pool* contendo os patógenos *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumonia* e *Haemophilus influenza* na concentração do ponto P3³⁶.

Em relação às análises e validações realizadas pelo usuário, conforme sugerido por Rabenau et al. (2007), foram realizados cálculos de Ct médio, desvio padrão e coeficiente de variação entre as corridas realizadas, conforme demonstrado na Tabela 20.

Como critérios de aceite, foram estabelecidos como satisfatórios os resultados que apresentaram um valor de desvio padrão entre as corridas abaixo de 3,32 e um coeficiente de variação entre as corridas abaixo de 10,00%. Estes valores foram definidos considerando as definições de Taylor et al. (2010), em que são esperados para resultados dentro do mesmo log de detecção uma variação inferior a 3,32 Cts entre as replicatas.

³⁵A plataforma QuantStudio™ 5 é um equipamento de PCR em tempo real da marca Thermo Fisher Scientific Inc. De acordo com a instrução de uso do kit XGEN MULTI MB, seu uso é considerado compatível com o kit.

³⁶Para cálculos de concentração verificar Tópico 4.3.2, Tabelas 6, 7 e 8.

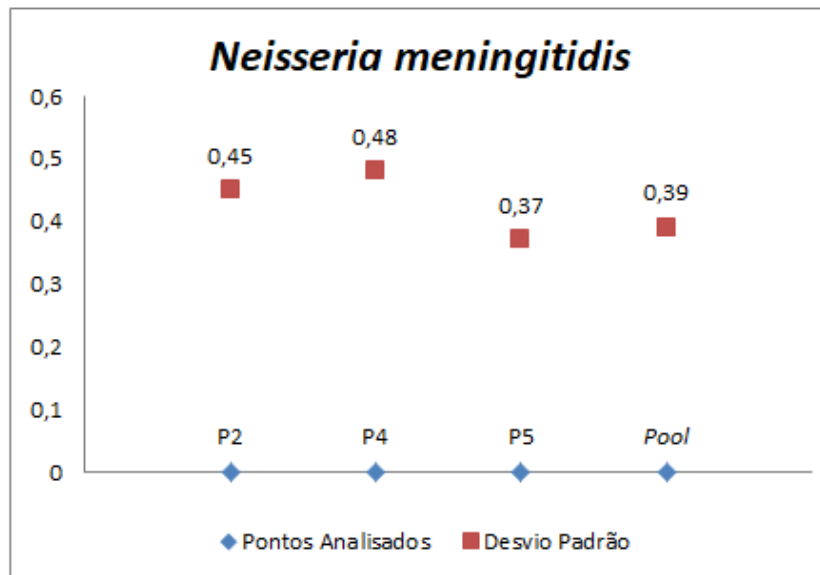
Tabela 20 – Ensaios de Exatidão/Acurácia

Alvo	Ct BD Max™	Ct QuantStudio™ 5	Ct Médio	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
<i>Neisseria meningitidis</i>					
Amostra Negativa	Indeterminado	Indeterminado	-	-	-
P2 – Replicata 1	29,6	28,7	29,2	0,45	0,02
P4 – Replicata 1	33,1	32,15	32,6	0,48	0,01
P5 – Replicata 1	33,3	32,49	32,8	0,37	0,01
P5 – Replicata 2	32,9	32,35			
Pool – Replicata 1	31,3	30,62	31,0	0,39	0,01
Pool – Replicata 2	31,5	30,65			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>					
Amostra Negativa	Indeterminado	Indeterminado	-	-	-
P2 – Replicata 1	33,4	33,46	33,4	0,03	0,00
P4 – Replicata 1	36,8	37,57	37,2	0,39	0,01
P5 – Replicata 1	35,6	37,62	37,3	1,20	0,03
P5 – Replicata 2	36,9	38,93			
Pool – Replicata 1	35,7	35,16	35,7	0,44	0,01
Pool – Replicata 2	36,4	35,66			
<i>Haemophilus influenzae</i>					
Amostra Negativa	Indeterminado	Indeterminado	-	-	-
P2 – Replicata 1	32,1	30,55	31,3	0,78	0,02
P4 – Replicata 1	37,9	35,16	36,5	1,37	0,04
P5 – Replicata 1	37,8	36,79	37,7	0,59	0,02
P5 – Replicata 2	38,4	37,95			
Pool – Replicata 1	35,8	34,8	34,8	0,71	0,02
Pool – Replicata 2	33,8	34,8			

Fonte: Próprio autor.

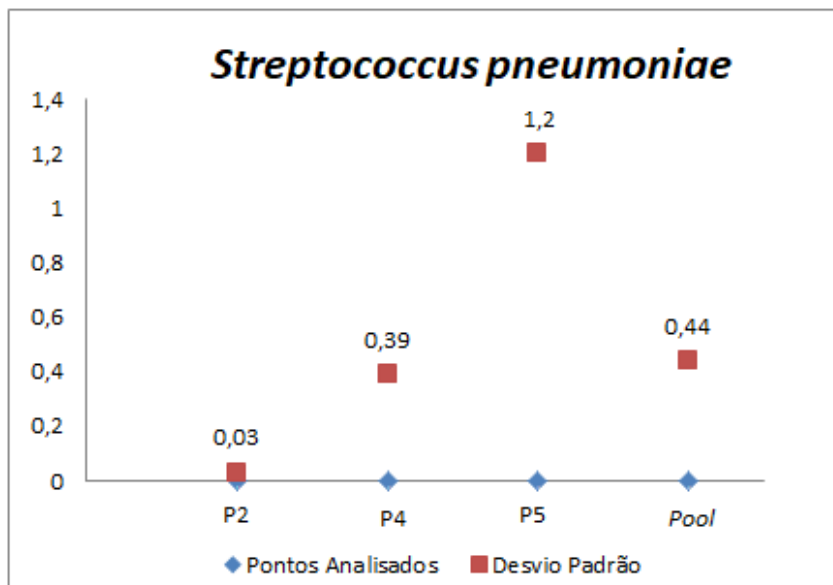
Após a análise, conforme demonstrado nas Figuras 48-50, os dados obtidos demonstraram: a) para o alvo *Neisseria meningitidis* um desvio padrão máximo de 0,48 com coeficiente de variação de 0,01% e um desvio padrão mínimo de 0,37 com coeficiente de variação de 0,01%; b) para o alvo *Streptococcus pneumoniae* um desvio padrão máximo de 1,20 com coeficiente de variação de 0,03% e um desvio padrão mínimo de 0,03 com coeficiente de variação de 0,00%; c) para o alvo *Haemophilus influenza* um desvio padrão máximo de 1,37 com coeficiente de variação de 0,04% e um desvio padrão mínimo de 0,59 com coeficiente de variação 0,02%.

Figura 48 – Resultados Ensaio de Exatidão - *Neisseria meningitidis*



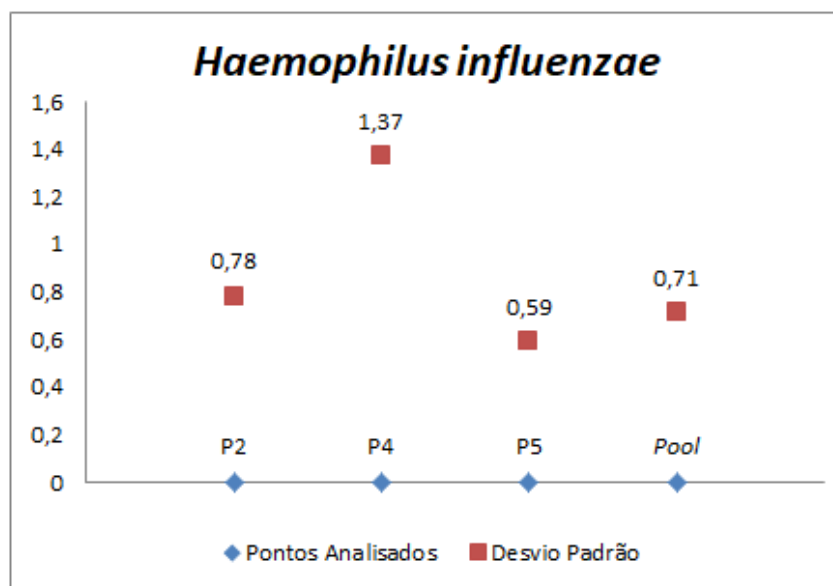
Fonte: Próprio autor.

Figura 49 – Resultados Ensaio de Exatidão - *Neisseria meningitidis*



Fonte: Próprio autor.

Figura 50 – Resultados Ensaio de Exatidão - *Neisseria meningitidis*



Fonte: Próprio autor.

Deste modo, os resultados obtidos neste ensaio confirmam a capacidade do SSM MB de detectar valores de medição próximos aos resultados obtidos pela plataforma QuantStudio™ 5 (aceitos como verdadeiramente corretos).

6. DISCUSSÃO

Os ensaios realizados (Tópico 5) tiveram como objetivo avaliar a efetividade do sistema sindrômico multiplex SSM MB para o diagnóstico de meningites bacterianas, através de ensaios de robustez, sensibilidade analítica, especificidade analítica, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão/acurácia. Deste modo, após a avaliação dos resultados obtidos, destacam-se os seguintes pontos para discussão.

6.1 ENSAIOS DE ROBUSTEZ

Para os ensaios de robustez, optou-se por trabalhar com um valor de ganho padrão para todos os canais ópticos testados ao invés de se utilizarem valores de ganho distintos, conforme descrito por Köller et al. (2016).

Esta modalidade de trabalho por ganho padrão, teve como objetivo otimizar o processo de ensaios e economizar reagentes e amostras, já que na modalidade descrita por Köller et al. (2016), além de termos uma metodologia de ensaio que não poderia ser aplicada para outras plataformas³⁷, também seria necessário a realização de ensaios de sensibilidade para todas as opções de ganho definidas em todos os alvos, o que aumentaria exponencialmente a quantidade materiais necessários para o teste (tópico que também não foi muito aprofundado pelos autores durante a descrição dos ensaios).

Além disso, durante a pesquisa de referências bibliográficas, não foram encontrados trabalhos prévios que utilizassem a plataforma BD Max™ System para diagnóstico de meningites bacterianas, o que impossibilita uma análise comparativa entre dos resultados de ganho definidos em relação a outros trabalhos.

Os únicos trabalhos encontrados durante a pesquisa bibliográfica que utilizaram a plataforma BD Max™ System, foram utilizados para detecção de: a) *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia Coli Enterotoxigênica*, *Vibrio* e *Plesiomonas shigelloides*, dos autores Simner et al. (2017); b) HSV1, HSV2 e VZV, dos autores Köller et al. (2016); c) *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*, da autora Van Der Pol (2017); d) *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Entamoeba histolytica*, dos autores Madison-

³⁷Diferentemente da plataforma BD Max™ System, nem todas as plataformas totalmente automatizadas são capazes de aplicar ganhos entre canais distintos dentro do mesmo ensaio.

Antenucci et al. (2016); e) *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Shigella spp.* e *Escherichia coli produtora de toxina Shiga*, dos autores Knabl; Grutsch; Orth-Höller (2016).

Deste modo, conforme demonstrado no tópico 4.3.1, ao final dos ensaios de robustez, utilizou-se um ganho padrão de 80 para todos os canais ópticos testados, sendo este o valor que demonstrou os melhores resultados para o sistema sindrômico multiplex SSM MB, com curvas de amplificação em formato exponencial, resultados de detecção válidos (de acordo com as instruções de uso do kit XGEN MULTI MB) e valores de fluorescência de acordo com o padrão observado na rotina, sem interferência em outros canais.

6.2 ENSAIOS DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Para os ensaios de sensibilidade analítica, primeiramente, foram considerados os dados disponibilizados pela plataforma BD Max™ System e as descrições realizadas por Jennings; Van Deerlin; Gulley (2009) e Newman; Maritz (2017) para classificação do sistema sindrômico multiplex SSM MB como sistema semiquantitativo.

A partir dessa classificação, e também para melhor controle dos pontos de diluição na realização dos ensaios, optou-se por utilizar 6 concentrações distintas em 4 replicatas até o limite de detecção, superando assim as recomendações de Newman; Maritz (2017), que indicam o uso de 5 concentrações distintas em 3-10 replicatas até o limite de detecção.

Conforme demonstrado nos ensaios realizados no tópico 4.3.2, ao final dos ensaios de sensibilidade analítica, foi considerado que o sistema sindrômico multiplex SSM MB é capaz de detectar os alvos *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* até uma concentração mínima de aproximadamente 13 cópias/μL de material extraído, sendo este o limite de detecção (LOD) atualmente considerado para o sistema.

Ressalta-se, no entanto, que este valor de 13 cópias/μL foi considerado como LOD, pois os pontos de diluição relativos ao LOD previamente estabelecido³⁸ não

³⁸O kit XGEN MULTI MB possui um LOD validado pelo fornecedor de 10 cópias/reação ou 2 cópias/μL de material extraído. Estes valores são aplicáveis para uso do kit em conjunto com equipamentos de PCR em tempo real convencionais, sendo necessárias a validação e definição de novos valores de LOD quando utilizado em conjunto com outros sistemas.

foram detectados durante os ensaios de sensibilidade analítica realizados neste estudo. Deste modo, como não havia um quantitativo de testes remanescentes suficientes para realização de mais ensaios de sensibilidade analítica, foi considerado o último ponto de diluição detectado como LOD, que seria equivalente a 6x o limite de detecção previamente estabelecido, ou 13 cópias/ μ L.

Neste ponto, verifica-se que o limite de detecção estabelecido neste estudo, se considerado apenas em relação a etapa experimental realizada, pode ser considerado como um ponto limitante, já que: a) não foi possível realizar ensaios posteriores para a definição exata do LOD de cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB (exemplo: análises consecutivas dos pontos com testes de 2x LOD, 3x LOD, 4xLOD, etc. até a detecção do ponto específico); b) não foram encontrados na pesquisa bibliográfica realizados trabalhos prévios que utilizassem a plataforma BD Max™ System para diagnóstico de meningites bacterianas, o que impossibilita uma análise comparativa entre dos resultados de sensibilidade analítica obtidos em relação a outros trabalhos; c) os únicos trabalhos para diagnóstico de meningites bacterianas em plataformas totalmente automatizadas encontrados durante a pesquisa bibliográfica, foram realizados em conjunto com a plataforma totalmente automatizada FilmArray® e seu painel molecular multiplex dedicado *FilmArray® Meningitis/ Encephalitis (ME) Panel*, autores Gutierrez, M.; Emmanuel, P. (2018) e Nestor, D. et al. (2019), o que também inviabiliza uma comparação direta por tratar-se de sistemas distintos³⁹.

Mesmo assim, apesar dos limitantes previamente mencionados, verifica-se que os resultados obtidos neste estudo podem ser considerados como demonstrativos da eficiência do SSM MB em termos de sensibilidade analítica, uma vez que ensaios semelhantes ao realizado também foram descritos por Piccirilli et al. (2018), Nestor et al. (2019), Mengelle et al. (2012), Gerber et al. (2014) e Pabbaraju, et al. (2015).

6.3 ENSAIOS DE ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Para os ensaios de especificidade analítica, optou-se por realizar a avaliação da capacidade de detecção apenas do patógeno alvo em seu canal específico, ou

³⁹Em geral, espera-se que sistemas que atuem de modo fechado apresentem uma melhor performance em relação aos sistemas abertos, uma vez que são otimizados para trabalhar com painéis moleculares específicos e com isso obter o menor LOD possível.

seja, sem a detecção nos canais referentes aos demais patógenos, além de ensaios de compensação de cor para correção dos sinais de fluorescência interferentes/invasão entre canais ópticos.

Em relação ao layout de validação, optou-se por realizar ensaios que se adequassem às sugestões dos autores Rabenau et al. (2007), Jennings; Van Deerlin; Gulley (2009), Newman; Maritz (2017) e BRASIL (2016), tanto em termos de definição, quanto em relação ao “n” amostral. Também foram consideradas como referências bibliográficas os trabalhos de Piccirilli, G. et al. (2018) e Köller, T. et al. (2016) que realizaram ensaios semelhantes aos propostos nos ensaios de validação.

No total, foram analisadas 40 amostras⁴⁰ possivelmente reativas para cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB, em conjunto com a realização de 4 ensaios de compensação de cor, para ajuste dos sinais de fluorescência interferentes/invasão entre canais ópticos obtidos, superando assim as recomendações de Rabenau et al. (2007), que indicam a análise de 20 amostras potencialmente reativas.

Deste modo, conforme demonstrado no tópico 4.3.3, verifica-se que, ao final dos ensaios de especificidade analítica, as configurações definidas para o SSM MB podem ser consideradas como demonstrativas da capacidade do sistema sindrômico multiplex SSM MB de realizar detecções apenas do patógeno alvo, em canal específico, sem indícios de interferência de fluorescência em outros canais ópticos.

6.4 ENSAIOS DE PRECISÃO

Para os ensaios de precisão, também foram considerados os dados disponibilizados pela plataforma BD Max™ System e as descrições realizadas por Jennings; Van Deerlin; Gulley (2009) e Newman; Maritz (2017) referente à classificação do sistema sindrômico multiplex SSM MB como sistema semiquantitativo.

A partir dessa classificação, para realização do desenho de validação, foram considerados como referências bibliográficas os trabalhos de Köller et al. (2016), Mengelle et al. (2012) e Gerber et al. (2014), especialmente em relação aos

⁴⁰O “n” amostral de 40 amostras mencionadas é referente a análise de 4 replicatas dos pontos P1 a P5 dos outros dois patógenos distintos do alvo. Para maiores informações verificar Tópico 4.3.3 com descritivo dos ensaios.

conceitos aplicados nos ensaios de reprodutibilidade, em que os autores consideraram a análise intercorridas como uma condição operacional para este tipo de ensaio.

Assim, para os ensaios de repetibilidade, os resultados foram confirmados por meio da capacidade do SSM MB de detectar medições sucessivas de um mesmo analito, em condições operacionais inalteradas, com resultados concordantes e dentro dos critérios de aceite proposto. Já para os ensaios de reprodutibilidade, os resultados foram confirmados por meio da capacidade do SSM MB de detectar medições sucessivas de um mesmo analito, em condições operacionais distintas, com resultados concordantes e dentro dos critérios de aceite proposto.

Deste modo, conforme demonstrado no tópico 4.3.4, os resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade podem ser considerados como demonstrativos da capacidade do sistema síndromico multiplex SSM MB de obter resultados concordantes entre as medidas realizadas.

6.5 ENSAIOS DE EXATIDÃO/ACURÁCIA

Para os ensaios de exatidão/acurácia, para verificar se os valores de medição obtidos estavam próximos do resultado aceito como verdadeiramente correto, optou-se por trabalhar com um comparativo entre plataformas distintas, utilizando ensaios simultâneos com 1 amostra negativa, 2 amostras positivas (pontos P2 e *pool* P3) e 2 amostras positivas baixas (pontos P4 e P5).

Este layout de validação teve como objetivo realizar ensaios que se adequassem às sugestões de Rabenau et al. (2007), que indicam para este tipo de ensaio o uso de 3 amostras positivas, 3 amostras positivas baixas e 3 amostras negativas. No entanto, devido às limitações de orçamento e disponibilidade de material, foi utilizado um “n” amostral levemente inferior ao indicado pelos autores.

De qualquer modo, apesar do limitante relacionado ao “n” amostral previamente mencionado, considera-se que os resultados obtidos nos ensaios de exatidão/acurácia podem ser considerados como satisfatórios, já que, conforme demonstrado na pesquisa bibliográfica, este “n” amostral pode variar muito entre os autores. Como exemplo, temos os trabalhos de Piccirilli et al. (2018), Köller et al. (2016), Mengelle et al. (2012), Gerber et al. (2014) e Hanson et al. (2016), que utilizam para este tipo de ensaio um “n” amostral que varia de 1 a 138 amostras.

Além disso, verifica-se que ainda não existe uma diretriz universal, ou até nacional, padronizando o número de ensaios que devem ser realizados dentro de cada critério de validação, pois, de acordo com Jennings; Van Deerlin; Gulley (2009), a correta definição e aplicação dos ensaios de performance realizados é de responsabilidade do usuário/laboratório.

Deste modo, conforme demonstrado no tópico 4.3.5, os resultados obtidos nos ensaios de exatidão/acurácia podem ser considerados como demonstrativos da capacidade do sistema sindrômico multiplex SSM MB de detectar valores de medição próximos aos resultados aceitos como verdadeiramente corretos. Ressalta-se, no entanto, que os dados obtidos neste ensaio não excluem a possibilidade de realização de estudos futuros com um “n” amostral maior, ou ensaios posteriores de âmbito clínico, já que estes pontos que não foram contemplados dentro do escopo deste trabalho.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme descrito nos ensaios realizados e posteriormente demonstrados nos resultados e discussões (Tópicos 5 e 6), verificou-se que o sistema sindrômico multiplex SSM MB apresentou: a) curvas de amplificação em formato exponencial, resultados de detecção válidos e valores de fluorescência de acordo com o padrão observado na rotina (ensaios de robustez); b) capacidade de detectar os alvos *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* até uma concentração mínima de aproximadamente 13 cópias/ μ L (ensaios de sensibilidade analítica); c) capacidade de realizar detecções apenas do patógeno alvo, em canal específico, sem indícios de interferência de fluorescência em outros canais ópticos (ensaios de especificidade analítica); d) capacidade de detectar medições sucessivas de um mesmo analito, em condições operacionais inalteradas e em condições operacionais distintas, com resultados concordantes e dentro dos critérios de aceite proposto (ensaios de precisão); e) capacidade de detectar valores de medição próximos aos resultados aceitos como verdadeiramente corretos (ensaios de exatidão/acurácia).

Em termos de limitações, conforme definido inicialmente nos objetivos, destaca-se que foram realizados apenas ensaios de performance analíticos, já que para validação de ensaios de performance clínicos, novos estudos precisariam ser realizados, tornando-se necessário, inclusive, a realização de nova pesquisa bibliográfica para embasamento.

Também não foram realizados ensaios adicionais de sensibilidade para a definição exata do LOD de cada patógeno contido no kit XGEN MULTI MB e ensaios de exatidão/acurácia com um “n” amostral maior, por motivos de orçamento e disponibilidade de material. Ficando neste caso, a realização destes ensaios identificados como limitantes, como sugestão para trabalhos futuros.

Deste modo, verificou-se que os resultados obtidos ao longo do trabalho demonstraram que o sistema sindrômico multiplex SSM MB atendeu aos objetivos previamente propostos e demonstrou resultados considerados como satisfatórios em todas as etapas realizadas. Tanto que, posteriormente, os dados gerados neste trabalho também serão utilizados como base pelo fabricante do kit XGEN MULTI MB (Fab.: Mobius LifeScience, Ref. XG-MB-MB-24), para atualização de registro do produto e inclusão da plataforma BD MAX™ System (Fab.: BD Diagnostics, Ref. BD

MAX™ System) como equipamento compatível com o kit, perante o atual órgão regulamentador de produtos para diagnóstico *in vitro* no Brasil (ANVISA).

REFERÊNCIAS

ARRUDA PARENTE FILHO, S. et al. Fatores prognósticos em pacientes graves com meningite bacteriana adquirida na comunidade e lesão renal aguda. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 30, n.2, p. 153-159, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5935/0103-507x.20180030>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbti/v30n2/0103-507X-rbti-30-02-0153.pdf>. Acesso em: 10 de abril de 2020.

BECTON DICKINSON AND COMPANY. **Manual do Usuário BD MAX System**. Juiz de Fora: Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas, 2016, Revisão 04, Versão B.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gerência de Produtos Diagnósticos de Uso *in vitro* – GEVIT. **MANUAL PARA REGULARIZAÇÃO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO NA ANVISA**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Manual%2Bpara%2BRegulariza%25C3%25A7%25C3%25A3o%2Bde%2BProdutos%2Bpara%2BDiagn%25C3%25B3stico%2Bde%2BUso%2BIn%2BVitro.pdf/6ea55858-7fad-4865-8f8b-d9e86eab6664?version=1.0>. Acesso em: 15 de maio de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0004_03_10_2017.html. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde – 3. ed. atual**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019a. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em 08 de maio de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, v. 50, n.3, 2019b. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/01/2018-038.pdf>. Acesso em: 04 de agosto de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos confirmados, óbitos, incidência (por 100.000 habitantes) e letalidade (%) por tipo de meningite. Brasil, 2010 a 2018***. Brasília: Ministério da Saúde, 2019c.

Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/25/tabela-dados-2010-2018-site.pdf>>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.82, n.3, p. 67-74, 2006. DOI: 10.2223/JPED.1475. Disponível em: <<http://www.jpmed.com.br/conteudo/06-82-S67/port.pdf>>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Epidemiology of Meningitis Caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae**. CDC, v.2, p. 14-21, 2011. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/full-manual.pdf>>. Acesso em 18 de agosto de 2019.

DAS, S.; SHIBIB, D. R; VERNON, M. O. The new frontier of diagnostics: Molecular assays and their role in infection prevention and control. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 2, p. 158-69, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.08.005>. Disponível em: <[https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(16\)30796-9/fulltext](https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(16)30796-9/fulltext)>. Acesso em: 09 de abril de 2020.

DE ALMEIDA, S.et al. Validation of multiplex PCR for the diagnosis of acute bacterial meningitis in culture negative cerebrospinal fluid. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 77, n. 4, p. 224-231, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0004-282x20190028>. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/anp/v77n4/1678-4227-anp-77-04-0224.pdf>>. Acesso em: 10 de abril de 2020.

DUARTE, R. M. R; DONALISIO, M. R; FRED, J. Avaliação da qualidade da atenção a doença meningocócica na Região Metropolitana de Campinas, 2000 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Brasília, v. 23, n. 4, p. 721-729. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742014000400014>. Disponível em: <<http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v23n4/v23n4a14.pdf>>. Acesso em: 10 de Abril de 2020.

FORBES, J. et al. Highlighting Clinical Metagenomics for Enhanced Diagnostic Decision-making: A Step Towards Wider Implementation. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 108–120, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.02.006>. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2001037017301198?token=1D59E27531>

CD89A451E7056267B1C0640E9B4183F42067F039AA170CE6CFA33F39720B4564B55D7D756148BCB9D10FE2>. Acesso em: 18 de janeiro de 2021.

FREITAS, H. S. A.; MERCHAN-HAMANN, E. Aspectos epidemiológicos da meningite pelo *Haemophilus influenzae* no Distrito Federal, Brasil, antes da introdução da vacina conjugada. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 25-34, 2004. Disponível em: <<http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v13n1/v13n1a04.pdf>>. Acesso em: 02 de abril de 2020.

GERBER P. et al. Comparison of real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of swine hepatitis E virus in fecal samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1045-1051, 2014. DOI: 10.1128/JCM.03118-1. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/jcm/52/4/1045.full.pdf>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2021.

GUTIERREZ, M.; EMMANUEL, P. Expanding Molecular Diagnostics for Central Nervous System Infections. **Advances in Pediatrics**, v. 65, n. 1, p. 209-227, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2018.04.005>. Disponível em: <[https://www.advancesinpeditrics.com/article/S0065-3101\(18\)30006-9/fulltext](https://www.advancesinpeditrics.com/article/S0065-3101(18)30006-9/fulltext)>. Acesso em: 10 de abril de 2020.

HANSON, K. et al. Preclinical Assessment of a Fully Automated Multiplex PCR Panel for Detection of Central Nervous System Pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 785-787, 2016. DOI: 10.1128/JCM.02850-15. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/jcm/early/2015/12/24/JCM.02850-15.full.pdf>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2021.

JENNINGS, L.; VAN DEERLIN, V.; GULLEY, M. CAP Laboratory Improvement Programs Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Tests. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 133, n. 5, p. 743-755, 2009. DOI: <https://doi.org/10.5858/133.5.743>. Disponível em: <<https://meridian.allenpress.com/aplm/article/133/5/743/460758/Recommended-Principles-and-Practices-for>>. Acesso em: 10 de Abril de 2020.

KNABL, L.; GRUTSCH, I.; ORTH-HÖLLER, D. Comparison of the BD MAX® Enteric Bacterial Panel assay with conventional diagnostic procedures in diarrheal stool samples. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 1, p. 131-136, 2016. DOI: 10.1007/s10096-015-2517-4. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26563899/>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2021.

KÖLLER T. et al. Implementation and evaluation of a fully automated multiplex real-time PCR assay on the BD max platform to detect and differentiate herpesviridae from cerebrospinal fluids. **PloS ONE**, v. 11, n.4, p. e.0153991, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0153991. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153991>>. Acesso em 05 de dezembro de 2020.

LEBER, A. L. et al. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2251-2261, 2016. DOI: 10.1128/JCM.00730-16. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5005480/pdf/zjm2251.pdf>>. Acesso em: 02 de abril de 2020.

MADISON-ANTENUCCI, S. et al. Multicenter evaluation of BD max enteric parasite real-time PCR assay for detection of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, and *Entamoeba histolytica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2681-2688, 2016. DOI: 10.1128/JCM.00765-16. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/jcm/54/11/2681.full.pdf>>. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2021.

MENGELLE C. et al. A new highly automated extraction system for quantitative real-time PCRs from whole blood samples: Routine monitoring of opportunistic infections in immunosuppressed patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 53, n. 4, p. 314-319, 2012. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.01.002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386653212000078?via%3DiHub>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2021.

MOBIUS LIFE SCIENCE. **Instruções de Uso XGEN MULTI MB**. Pinhais: Mobius Life Science Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., 2020, Revisão 00, março. Nascimento-Carvalho, C. M.; de Andrade, A. L. S. S. Haemophilus influenzae type b vaccination: long-term protection. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.82, n.3, p.109-14, 2006. DOI: 10.2223/JPED.1501. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/jped/v82n3s0/v82n3sa13.pdf>>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

NESTOR, D. et al. Evaluation of the FilmArray™ Meningitis/Encephalitis panel with focus on bacteria and Cryptococcus spp. **Journal of Microbiological Methods**, v. 157, p. 113–116, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.003>. Disponível

em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701218307073?via%3Dihub>>. Acesso em 06 de dezembro de 2020.

NEWMAN H., MARITZ J. Basic overview of method validation in the clinical virology laboratory. **Reviews in Medical Virology**; p. e1940, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.1940>. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28857345/>>. Acesso em: 10 de abril de 2020.

PABBARAJU K. et al. Detection of enteroviruses and parechoviruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. **Molecular and Cellular Probes**, v. 29, n. 2, p. 81-85, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2015.02.001>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089085081500016X?via%3Dihub>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2021.

PATEL, R. New Developments in Clinical Bacteriology Laboratories. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 91, n. 10, p. 1448-1459, 2016. DOI: 10.1016/j.mayocp.2016.06.020 Disponível em: <<https://www.mayoclinicproceedings.org/action/showPdf?pii=S0025-6196%2816%2930338-X>>. Acesso em: 30 de Abril de 2020.

PICCIRILLI, G. et al. Infectious meningitis/encephalitis: evaluation of a rapid and fully automated multiplex PCR in the microbiological diagnostic workup. **New Microbiologica**, v.41, n.2, p.118-125, 2018. Disponível em: <http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2018/2/118.pdf>. Acesso em: 02 de Abril de 2020.

RABENAU, H. et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. **Journal of Clinical Virology**, v. 40, n. 2, p. 93-98, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.07.009>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386653207002582>>. Acesso em: 02 de Abril de 2020.

RELICH, R.; ABBOTT, A. Syndromic and Point-of-Care Molecular Testing. **Advances in Molecular Pathology**, v. 1, n. 1, p. 97–113, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yamp.2018.07.007>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589408018300188?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 de abril de 2020.

RODRIGUES, C.; DESAI, N.; FERNANDES, H. Molecular Diagnosis in Resource-Limited Settings. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.38, n.7, p.51-56, 2016.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2016.03.004>>. Acesso em: 02 de abril de 2020.

SIMNER, P. J. et al. Multisite evaluation of the BD Max extended enteric bacterial panel for detection of *Yersinia enterocolitica*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Vibrio*, and *Plesiomonas shigelloides* from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n.11, p. 3258-3266, 2017. DOI: 10.1128/JCM.00911-17. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/jcm/55/11/3258.full.pdf>>. Acesso em 27 de Abril de 2020.

SNYDER, J. The Changing Landscape of Automation in the Practice of Diagnostic Medical Microbiology: But What about Safety?. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 38, n.8, p. 61-65, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2016.04.001>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196439916300253?via%3DiHub>>. Acesso em: 27 de Abril de 2020.

TAYLOR, S. et al. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, n.4, p. S1–S5, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202310000204?via%3DiHub>>. Acesso em 08 de novembro de 2020.

TROTTER, A. et al. Recent and emerging technologies for the rapid diagnosis of infection and antimicrobial resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.51, p.39-45, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.03.001>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527418301279?via%3DiHub>>. Acesso em: 09 de Abril de 2020.

VAN DER POL, B. Profile of the triplex assay for detection of chlamydia, gonorrhea and trichomonas using the BD MAX™ System. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 6, p. 539-547, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2017.1321988>. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737159.2017.1321988>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2021.

VIEIRA, A. C. et al. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 83, n.1, p.71-8, 2007. DOI: 10.2223/JPED.1580. Disponível em: <<http://www.jpmed.com.br/conteudo/07-83-01-71/port.pdf>>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

WAGNER, K. et al. Pathogen identification by multiplex LightMix real-time PCR assay in patients with meningitis and culture-negative cerebrospinal fluid specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. e01492-17. DOI: 10.1128/JCM.01492-17. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/jcm/56/2/e01492-17.full.pdf>>. Acesso em: 13 de abril de 2020.